

## 1. ВОВЕД

Виното со својата комплексност отсекогаш го воодушевувал човекот. Честопати виното е опишувано како „хемиска симфонија“, „поезија во шише“, „затворена сончева светлина“ (Grivetti, 1996).

Терминот „вино“ се однесува на производ добиен со алкохолна ферментација на сок од грозје со помош на квасец (*Sacharomyces cerevisiae*), или како што некои велат, виното е мешавина на хемија, биологија и психологија. Според Oxford English Dictionary, терминот „вино“ е дефиниран како „ферментиран сок од грозје што се користи како пијалак“ (Хорнси, 2007).

Според Louis Grivetti, професор од Универзитетот во Дејвис Калифорнија, виното е „храна со две лица“, бидејќи „возвишува кога се пие, а проколнува кога ќе се испие премногу“ (Grivetti, 1996).

### 1.1. Историски преглед на развојот на лозарството и винарството

Производството на вино е старо колку што е старо и човештвото. Точното време кога луѓето за првпат го вкусиле и вклучиле виното во нивната исхрана можеби никогаш нема да биде откриено, но затоа пак му претходи богатата пишана историја со фосилни остатоци од многу милиони години (Бајн, 1997). Фосилни остатоци од винова лоза се пронајдени на териториите на Франција и Германија, пред околу 500 милиони години, остатоци што се слични на европската лоза *Ampelopsis*. Се смета дека ова било плодниот предок на виновата лоза што го дава винското грозје (Бајн, 1997).

Родот *Vitis* првпат се појавува во терцијерниот период пред околу 50 милиони години. Ова енергично растение поминало многу преобразби во текот на милиони години за да достигне до денешнава културна лоза *Vitis vinifera* L. (Бајн, 1997). Еден од првите посебни видови што се појавил од овој род е *Vitis sezzannensis* кој го добива името по локалитетот Sezzannensis во регионот Шампањ во Франција. Многу видови од родот *Vitis* еволуирале, меѓу кои бил и видот *Vitis vinifera* L., од којшто подоцна се добиени стотици европски сорти (Бајн, 1997).

Во ерата на мезозоикот, палеонтолозите откриваат дека феноменот на ферментација за првпат се појавува пред околу 100 милиони години. Ферментирани пијалаци направени од грозје им биле познати на кромањонците и тие биле први кои уживале во напиток во форма на вино (Вајн, 1997). Во времето на неолитот, пред околу 8000 години, жителите од северна Италија ја одгледувале лозата, правеле вино и уживале во него со различни комбинации на разновидна храна, леб, риба, месо, морски плодови и сл.

Од времето на античките Македонци, добро е познато дека богот Дионис бил создаден во имажинација на македонското племе Бриги кои го славеле и чествувале, а подоцна истиот бог бил прифатен и од останатите народи на Балканот (Вајн, 1997; Camara et al., 1990). Римјаните пак, богот на виното го нарекле Бахус, а Египќаните го славеле богот Озирис. Во нивна чест, Македонците и останати народи се развеселувале и приредувале посебни манифестации познати под името „баханалии“, каде што пиеле и наздравувале со вино. Им било познато дека силните и богати вина полесно и подолго време може да бидат чувани во здрава состојба, а од таму и практиката да се произведуваат посилни и појаки вина од добро и зрело грозје.

Во своите дела Илијада и Одисеја, Хомер во оригиналниот јазик го спомнува зборот вино како „оинос“ кој е сличен на денешниот македонски збор за вино „вино“. Во ова античко дело, виното е спомнато на стотина места (Вајн, 1997).

Во науката се смета дека лозата на Балканот била распространета уште пред околу 4000 години. Во книгата „Weine aus aller Welt“ од авторите Caroline Camarra, Francoise, Collombet, Jean- Paul Paireault и Karl Muller Verlag, 1995, се вели: „Историјата на лозарството потекнува од пред 4000 години од Тракија, преку ридестата Македонија на медитеранскиот Балкан...“. Потоа културата за вино почнала да се шири и преку Римската Империја низ цела Европа.

Најголем напредок на лозарството и винарството во Р. Македонија се бележи во периодот на осумдесеттите години на минатиот век, кога лозовите насади достигнуваат до 38 000 ha што претставува основа за проширување на винските капацитети во државата. Во трудот „Состојбата на сортите трпезно грозје во Р. Македонија“ (The state of table grape varieties in R. Macedonia) од Димовска и соработници (2011), изнесени се статистички податоци за површините под лозови насади во периодот од 1995 до 1999 год., при што е

сумирано дека во Македонија во тој период има 28 700 ha површина со лозови насади, што претставува 4,5 % од вкупната обработлива површина во државата, додека во 2008 год. е забележано намалување на површините со лозови насади на 22 401 ha, што е 4,3 % од вкупната обработлива површина во Р. Македонија.

Во вторта половина на XIX век, по многубројни истражувања од страна на голем број научници, Луј Пастер конечно дава значење на идејата дека етанолската ферментација е спроведена од мали, живи организми, а не само од серија на безживотни хемиски реакции. Ова откритие го објаснува Пастер преку својот труд „**Студии за вино**“ (Etudes sur le vin) во 1866 година, кое е основа на винарството што и денес се применува.

Карактеристичната анализа на виното од пред 150 години изгледала вака:

*Според Гмелин/Gmelin („Прирачник за хемија“) б.ii,стр.1255), составните делови на виното се: алкохол, миризлива основа (испарливо масло), материја што ѝ дава сина боја на лушпата (кај црвените вина), танин, горчливи екстракти, шеќери (особено кај слатките вина), смоли, квасци, оцетна киселина (од започнувањето на оцетно-киселинската ферментација), јаболкова киселина, винска киселина, калиум битартарат, битартарат од вар, суфати и хлориди, фосфати од вар, јаглородна киселина (во вина кои ферментираат) и вода (Маргалит, 2011).*

Голем напредок во квалитетот на виното се постигнува по откритието на SO<sub>2</sub> како средство за заштита од оксидација, и неговата широка употреба при производството на вино.

Виното е природен пијалак што не бара претходно термичка обработка - варење, додека современите материјали, машини, технологии и методи на работа придонесуваат да се подобри неговиот квалитет.

Уште од римскиот период постојат податоци за користење на дабот *Quercus spp.* за производство на садови за вино. Најчесто дабот се употребувал за зреење, но и за ферментација на вината. Вкусот што се добива од бурето го зајакнува карактерот на виното, со препознатливи ароми кои потекнуваат од дабот (Џексон, 2013).

Од препорачаните и дозволени вински сорти за одгледување во Р. Македонија, сортата вранец е доминантна и го зазема најголемиот процент од црвените сорти на грозје.

## **1.2.   Опис на сортата Вранец**

Според авторот Божиновиќ (1996), оваа винска сорта потекнува од Црна Гора, од околината на Црмница и Црноморското Приморје, а може да се сретне и под следниве синоними и тоа: вранац, вранац црногорски, вранац прхљавац. Сортата е распространета и во Хрватска, во далматинскиот вински регион и на помали површини во Србија. Во Македонија, сортата Вранец е водечка винска сорта и е распространета во сите виногорја. Оваа сорта го карактеризира типот на македонските црвени вина.

Според обележјата на листот, гроздот и зрното, оваа винска сорта припаѓа на еколошко географската група црноморски сорти, подгрупа *balkanica*.

Според ботаничкиот опис, врвот на младиот ластар е малку повиен и мовлест, има бледо жолтозеленикава нијанса со розови рабови. *Зрелиот ластар* е дебел и валчест, има куси интернодии и нормално изразени коленца, а кората на ластарот е ребреста и обоена сивокостенливо. Лозата има голем петоделен лист, со средно длабоки горни синуси и плитки долни синуси, а дршкиниот синус е најчесто затворен. Лиската има голо лице, темнозелена и сјајна, а опачината е рапава и со четини по нервите. Има средно големи и остри запци, лисната дршка е долга и мазна, делумно прелиена со црвенкаста нијанса. Цветот е морфолошки и функционално хермафродитен и има висока ѓртливост на поленот.

Сортата Вранец има средно голем или голем грозд, валчесто издолжен и проширен, секогаш е со едно или две крилца. Гроздот е средно збиен или растресит, поставен на долга, во основата здрвенета дршка. Има средно големо зрно со издолжена форма, средно дебела лушпа, мазна, без 'рѓести точки и малку истакната пупка. Лушпата на зрната е обоена темносино, богата со обоени материи (антоцијани) и е покриена со восочен прашец, а месото е сочно, безбојно и вкусно. При технолошката зрелост, зрното лесно се одвојува од петелката. Масата на гроздот иснесува од 220 до 300 g. Гроздот има добра

структура и обезбедува висок рандеман на ширата, а процентот на застапеноста на зрното е 97 %.

Во Тиквешкото Виногорје, сортата Вранец спаѓа во III епоха на зреење, но со промената на климатските фактори, почнува да зрее кон крајот на август и почеток на септември. Лозата на оваа сорта е бујна, редовно и добро се оплодува, со висок процент на автогамно оплодување до 32 %. Родноста на окцата се зголемува од основата кон средината на родниот лак и опаѓа кон врвот. Одлични резултати дава со ниско кроење од 3 до 4 окца, а најмногу одговара шпалирен систем на одгледување, со ниско или средно високо стебло и кратки кордуници. Поголем принос дава со Гиов начин, при што на родниот лак има до 8 окца, без да се намали квалитетот на родот.

Вранец спаѓа во групата на високоприносни сорти и најдобри резултати дава на средно плодни и умерено влажни почви, со јужна или југоисточна експозиција. Не поднесува ниски терени и влажни почви. На суша е средно издржлива сорта, и затоа препорачливо е да се избегнуваат слаби и суви почви. Има одличен афинитет со подлогите Kober 5BB, ШАСЛА 41B, SO<sub>4</sub>. Оваа сорта е средно отпорна на пламеница, а на пепелница и сиво гниење е поотпорна. Осетлива е на зимски ниски температури, како и раните пролетни мразови, при што доаѓа до мрзнење на ластарите или на дел од родните окца. Вранец е сорта на топла клима, во посеверните и посвежи реони не дава добри приноси и квалитет на родот.

Според механичкиот состав на зрното, месото учествува со 86 %, семките со 4 %, а лушпите со 10 %. Ширата содржи 210 до 280 g/L шеќер и 6-8 g/L вкупни киселини. Грозјето има особина брзо да презрева, при што се зголемува содржината на шеќери над 280 g/L. Во наши услови, Вранец е типична винска сорта која обезбедува суровина за производство на квалитетни црвени вина. Во зависност од микролокацијата и начинот на обработка на лозовиот насад, вината содржат од 11 до 15 % (v/v) алкохол, богати се со екстракт и обоени материи.

### **1.2.1. Опис на вината од сортата Вранец**

Вината од сортата Вранец се јако обоени, со темноцрвена боја која се споредува со бојата на презреана вишна. Доминираат ароми на црно овошје капини, малини, сливи, цреша, вишна, коишто доаѓаат до израз по неговото ферментирање и зреење. Вината изобилуваат со танини што се типични за сортата, а соодносот на алкохолот со киселините и богатиот екстракт на виното му дава богата структура, хармоничност и избалансиран вкус и после вкус.

### **1.2.2. Хемиски состав на грозје и вино**

Грозјето и виното се сложени матрици кои содржат различни групи на соединенија: органски киселини, јаглехидрати, протеини, феноли, испарливи ароматични соединенија, минерали, витамини, азотни соединенија, итн. Овие компоненти влијаат врз аромата и вкусот на грозјето и виното, а алкохолите, естрите, алдехидите, влијаат врз аромата на виното дури и при многу ниски концентрации (во ранг на ng/L). Од сите ароми, најзастапени се вишите алкохоли и естрите и тие најмногу придонесуваат за аромата на виното (Ivanova et al. 2012a).

Структурата на зрното го сочинуваат следниве компоненти изразени во % и тоа во најголем процент е присутен сокот, во просек 75 %, а во најмал процент е семката, во просек 4 %.

Компоненти	Застапеност (%)	Просек (%)
Сок	70 - 80	75
Лушпа	10 - 20	16
Цврсти делови	2 - 6	5
Семки	0 - 5	4

Хемискиот состав на ширата е покомплексен, но во основа таа е составена од најголем процент на вода (просек 79 %), а најмал процент на неоргански киселини кои во просек се 0,2 %.

Компоненти	Застапеност (%)	Просек (%)
Вода	75 - 85	79
Јаглехидрати	17 - 25	20
Органски киселини	0,40 - 1,2	0,6
Неоргански киселини	0,15 - 0,30	0,2
Останати компоненти	0,3 - 1,0	0,5

Најзастапени јаглехидрати во ширата се глюкоза и фруктоза, што заедно сочинунваат 95,2 % од вкупните јаглехидрати, а најмал процент на застапеност имаат пектините, само 0,6 %.

Компоненти	Застапеност (%)
Глукоза	47,6
Фруктоза	47,6
Сахароза	3,1
Пентоза	1,1
Пектини	0,6

Според својот хемиски состав, виното е посложена матрица во однос на ширата, бидејќи во текот на мацерацијата, алкохолната ферментација и зреењето, во виното се создаваат нови соединенија (стабилни пигменти, естри, алкохоли).

Хемискиот состав на виното најмногу зависи од сортата, составот и квалитетот на грозјето, винификацијата, одгледувањето и зреењето на виното. Така на пример, вината од сортата Вранец се одликуваат со интензивна темноцрвена боја на рубин, богати се со полифеноли и антоцијани (Ivanova et al., 2010).

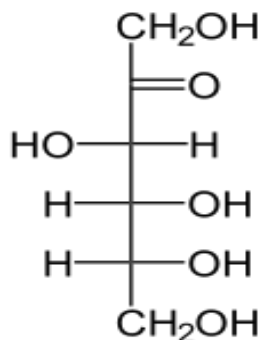
**Водата** е доминантна компонента во виното, присутна од 80 до 90 %. Во неа се растворени најголем дел од компонентите на виното. Вината побогати со екстракт содржат помалку вода, а тоа значи и дека се поквалитетни вина (Хорнси, 2007).

**Алкохолот (етил алкохол или етанол)** е производ на алкохолната ферментација и претставува важна компонента која го одредува квалитетот на виното. Содржината на алкохол се движи од 10 до 15 %. Етанолот ( $C_2H_5OH$ ) е безбојна течност, со мала специфична тежина и е лесно запалив.

**Глицерол** ( $C_3H_6(OH)_3$ ) е густа, безбојна, вискозна течност, без мирис и има сладникав вкус. Просечно, вината содржат од 6 до 9 g/L глицерол.

Шеќерите се јаглехидрати кои се разликуваат по функционалната група, алдехидна или кето-група. Јаглехидратите се поделени во три групи: моносахариди (глюкоза, фруктоза), дисахариди (сахароза) и полисахариди (пектини, глукани, декстрини). Основните моносахариди присутни во грозјето се глюкоза и фруктоза. Тие се присутни во речиси еднакви количини во грозјето, освен во презреано грозје каде што количините на фруктоза многу често се поголеми. Во грозјето може да бидат присутни и други шеќери, но во многу ниски концентрации. Сахарозата многу ретко е присутна во грозје од сортите *Vitis vinifera*, додека во сорти кои не се *Vitis vinifera*, таа може да сочинува и до 10 % од вкупните количини на јаглехидрати во грозјето. Сахарозата се акумулира во листовите од лозата во текот на фотосинтезата, но при трансверот во гроздовите, таа хидролизира, при што се формираат есенцијалните шеќери, глюкоза и фруктоза (сл. 1). Од хидролизирачките резерви на јаглехидрати сместени во гранките од лозата, сахарозата може да премине во сокот од грозјето во форма на целулоза или скроб. Сахарозата сама за себе не ферментира, туку, за таа цел потребно е присуството на ензимот инвертаза што ја разградува до глюкоза и фруктоза (Иванова, 2013).

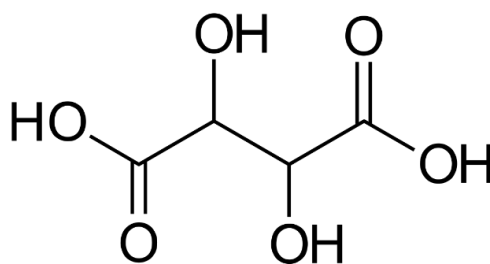




Слика 1. Структурна формула на *D*-фруктоза

Figure 1. Structural formula of D-fructose

**Киселините** се важни компоненти на виното. Тие влијаат врз неговата микробиолошка и хемиска стабилност, бојата, степенот на зрелост, стабилноста и перцепцијата за балансиран вкус во виното. Органските киселини се присутни во грозјето, а некои настануваат во текот на алкохолната ферментација и зреењето на виното. Просечно, виното содржи од 5,5 до 8 g/L. вкупни киселини. Доминантна киселина во грозјето и виното е винската киселина (сл. 2), а присутни се и јабolkовата и лимонската, додека во текот на винификацијата се формираат млечна, килибарна, оксална и оцетна киселина.



Слика 2. Структурна формула на винска киселина

Figure 2. Structural formula of tartaric acid

**Полифенолите** се група на соединенија што имаат примарно значење за карактеристиките и квалитетот на црвените вина и претставуваат голема и комплексна група на соединенија со различни структури, присутни во грозјето и виното. Фенолите и нивните деривати влијаат и го одредуваат вкусот, бојата, структурата и заокруженоста на вината. Тие се и антиоксиданти на виното, а неговиот антиоксидативен потенцијал во голема мерка зависи од неговиот фенолен состав (Burns et al., 2000).

Полифенолите се хетерогена фамилија составена од две главни групи: флавоноиди и не флавоноиди.

1. Флавоноидите се составени од:

- антоцијани;
- флаван-3-оли или танини (мономери и полимери);
- флавоноли;
- дихидрофлавоноли.

2. Нефлавоноидите се составени од:

- хидроксibenзоеви киселини и нивни деривати;
- хидроксициметни киселини и нивни деривати;
- стилбени.

**Флавоноидите** постојат во слободна форма или се полимеризирани со други флавоноиди, шеќери, нефлавоноиди или можна е комбинација на овие компоненти со примарните нефлавоноиди, како што се дериватите на хидроксициметни киселини, и обично естерифицирани со шеќери, органски киселини или различни алкохоли (Иванова, 2009). Тие се делат на следните групи: флавани, флаванони, флавони, флавоноли, дихидрофлавоноли, флаван-3-оли, флаван-4-оли и флаван-3,4-диоли.

**Флаванолите** од грозјето, најчесто се нарекуваат флаван-3-оли и се сретнуваат како мономери, но и како олигомери и полимери. Главните флаван-3-ол мономери во грозјето се: (+)-катехин и неговиот изомер, (-)-епикатехин, а додека во помали концентрации се сретнуваат (-)-епикатехин и (-)-епикатехин-3-О-галат. Олигомерите и полимерите се нарекуваат и кондензирани танини или проантоцијанидини (Иванова, 2009).

**Танините** се присутни во вината и нивната содржината зависи од ферментацијата и зреењето на виното. Во виното е присутен од 0,5 до 6 g/L (Хорнси, 2007).

**Антоцијаните** се црвените компоненти што се одговорни за бојата на црвеното грозје и црвеното вино. Тие се наоѓаат во лушпата од зрната, освен во сортите „бојадисери“ кои содржат антоцијани и во пулпата. Во грозјето и виното се познати 5 антоцијандини, и тоа: делфинидин, цијанидин, петунидин, пејонидин и малвидин (Иванова, 2009).

Со преработката на грозјето, за време мацерацијата и алкохолната ферментација, под дејство на јаглерод диоксид и алкохол, антоцијаните се екстрахираат од лушпата и преминуваат во ширата, при што виното добива црвена боја. Од содржината на екстрахирани антоцијани ќе зависи и интензитетот на бојата на виното (Puškaš, 2010).

Црвените сорти грозје содржат различна концентрација на антоцијани, а тоа зависи од условите на одгледување на грозјето. Така, исти сорти на грозје, одгледувани на различни географски области, може да се разликуваат во бојата. Исто така, бојата на виното од исти сорти може да биде различна во зависност од начинот на обработката, времетраењето и температурата на мацерација, но и од содржината на сулфур диоксид што се додава за да се заштити виното од оксидација (Puškaš, 2010).

Главни **нефлааноиди** во грозјето и виното што содржат еден ароматичен прстен се дериватите на хидроксициметни и хидроксибензоеви киселини. Друга класа на нефлаваноиди се стилбени и стилбени глукозиди.

**Хидроксибензоеви киселини** се: гална киселина, *p*-хидроксибензоева киселина, протокатехинска киселина, салицилна киселина, сиригитинска киселина и ванилна киселина. Во грозјето се присутни во форма на естри и гликозиди. **Хидроксициметните киселини** кои се присутни во виното се: кафена киселина, *p*-кумарна киселина, ферулна киселина и синапинска киселина (Puškaš, 2010).

**Стилбените** се поткласа на фенолните компоненти што се биосинтетизираат во виновата лоза, како одбранбен систем од фунгална инфекција, најчесто *Botrytis cinerea*, но и како заштита од UV-радијација. Во текот на винификацијата, стилбените преминуваат во виното во многу мали концентрации. Најзначајниот стилбен е трансресвератрол. Ресвератролот

постои во две изомерни форми (*cis-* и *trans-*форма) кои може да бидат слободни или  $\beta$ -глюкоконјугирани (Иванова, 2009).

### 1.3. Ароматични соединенија

Во грозјето и виното се идентификувани различни групи на *ароматични соединенија*, како што се: алкохоли, естри, алдехиди, лактони, терпени и феноли. Овие соединенија влијаат врз аромата дури и при ниски концентрации. Од сите тие, алкохолите и естрите се главните компоненти кои се присутни во највисоки концентрации во виното. Естрите имаат овошни ароми и значително влијаат врз мирисот на виното (Ivanova et al., 2012; Ivanova et al., 2014).

Испарливите соединенија во виното се најважните компоненти што влијаат врз формирање на аромите во виното. Тие се одговорни за квалитетот на грозјето и виното. Во науката се познати повеќе од 1 000 компоненти поделени во различни групи: виши алкохоли, естери, алдехиди, лактони, масни киселини, терпени, испарливи феноли, сулфурни и азотни соединенија, кои што се идентификувани во виното (Mendes, Gonçalves & Câmara, 2012, Ivanova et al. 2012, Perestrelo, Caldeira, Rodrigues & Câmara, 2008).

Еден дел од испарливите соединенија се присутни во грозјето, и од таму преминуваат во виното во текот на винификацијата, но поголем дел од нив се секундарни метаболити на квасецот и се создаваат во текот на алкохолната ферментација и при зреењето на виното.

Според потеклото, ароматичните соединенија се поделени во три групи:

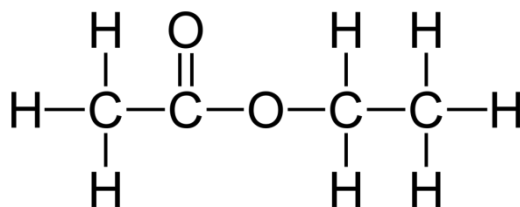
- Основни ароматични соединенија што се присутни во грозјето и опстојуваат во текот и до крајот на процесот на добивање на вино;
- Секундарни ароматични соединенија што се продукт на алкохолната ферментација и
- Терциерни ароматични соединенија што се создаваат во текот на зреењето на виното (во дрво или шише) (Хорнси, 2007),

**Естрите** се важни испарливи компоненти кои имаат овошни ароми и значително влијаат врз мирисот на виното (Ivanova et al., 2012; Ivanova et al., 2014). Тие се производ на реакција на естерификација меѓу алкохолите и киселините. Доминантен естер во виното е етил ацетат, што е и очекувано,

бидејќи овој естер се формира од најзастапените: алкохол (етанол) и киселина (оцетната киселина). Повеќето естри во виното ги има во траги, имаат мала испарливост, слаб мирис, но нивното влијание врз сензорните особини на виното не е занемарливо.

Концентрациите на испарливите естри се ниски и при нивно сензорно забележување се опишуваат како арома од овошен вид, освен за *етил ацетат*, кој може да има и повисока концентрација во вината, што се смета за негативно. Присуството на етил ацетат ( $\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-O-CO-CH}_3$ ) во вината се движи во различна концентрација, главно во опсег од 50 до 100 mg/L. При пониски концентрации (< 50 mg/L), етил ацетат позитивно влијае врз вкусот и аромата на виното и придонесува за комплексноста, додека при повисоки концентрации (> 150 mg/L), создава непријатен мирис на ацетон (Amerine и Roessler, 1983).

Постојат и други естри во виното што имаат позитивно влијание врз аромата, како што се *изоамил ацетат* со мирис на банана, и *бензил ацетат* со мирис на јаболко. Овие два естра имаат големо влијание врз винското буке кај младите вина, особено кај белите вина (Vernin et al., 1986). На сл. 3 е прикажана структурната формула на етил ацетат.



Слика 3. Структурна формула на етил ацетат

Figure 3. Structural formula of ethyl acetate

Присуството на **масни киселини** во виното зависи од составот на ширата и условите за време на ферментацијата. Масните киселини може да формираат естри и тоа да биде причина за намалување на нивната содржина за време на мацерацијата. Но, бидејќи се присутни во ниски концентрации, нивните непријатни мириси не влијаат негативно врз квалитетот на виното. Најзначајни масни киселини се: бутанска, *iso*-валеријанска, 2-метил-бутанска, хексанска и други киселини (Иванова, 2009).

**Карбонилните соединенија** се формираат по пат на оксидација на алкохолите во алдехиди и кетони. **Алдехидите** имаат алдехидна група (-CHO) што се наоѓа на крајот од молекулата, додека кетоните содржат кето-група што пак, може да се наоѓа во внатрешноста на молекулата. Во грозјето се создаваат неколку алдехиди како што се 3-метил бутанал и *n*-хептанал. Алдехидите се доминантни и од голема важност за сортните ароми. Тие имаат тревести или хербални мириси и се создаваат за време на мацерацијата на гроздовата каша (Џексон, 2013).

**Кетоните** се присутни во грозјето и ги има неколку: 3-хидрокси-2-бутанон, 2-октанон и други. Тие имаат интензивен мирис на егзотични цвеќиња и рози, препознатлива арома за некои бели сорти на грозје, додека мирисот на љубичица и малина се значајни за некои црвени сорти на грозје, пр. за мерло, пино ноар (Џексон, 2013).

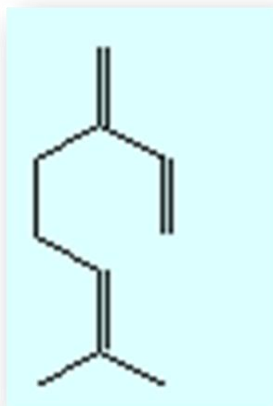
**Терпените** се многу значајна група на ароматични соединенија што даваат карактеристичен мирис и арома на цвеќиња, плодови, семки, листови, дрвја, корења и сл. Тие се многу важни за хербалните вина како што се: траминец, темјаника, мускат хамбург, совињон бланк. За специјалните ароматизирани вина вермут, бермет и сл., кои се прават со додавање на ароматични билки, овошни плодови, алкохол, овие соединенија се од голема важност. Од виното се изолирани околу педесет монотерпенски соединенија.

Терпените и нивните деривати, што се наречени терпеноиди, се јавуваат како примарни компоненти на грозјето и се метаболити на мевалонската киселина (Хорнси, 2007).

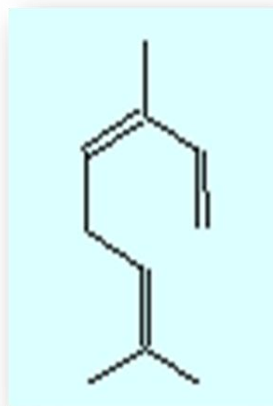
Терпените се групирани според нивната препознатлива јаглеродна структура. Обично се составени од две, три, четири или шест изопренски единици и може да содржат различни функционални групи. Многу важни терпени содржат хидроксилни групи, поради што спаѓаат во терпенски алкохоли. Терпените главно потекнуваат од грозјето, т.е. од лушпата на зрното. Во грозјето може да се сретнат како слободни монотерпенски алкохоли и оксиди и во оваа форма тие се испарливи и придонесуваат за мирисот во виното. За ослободување на врзаните терпени, потребно е додавање на ензимски препарати за време на ферментацијата на виното со цел раскинување на гликозидните врски и ослободување на врзаните терпени

(Џексон, 2013). На слика 4 се приказани хемиски структури на позначајни терпени.

### **Јаглеводороди**

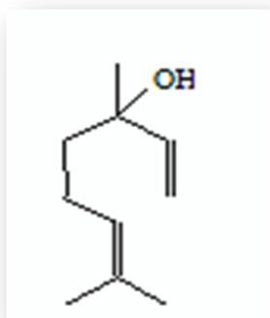


**мирцен**

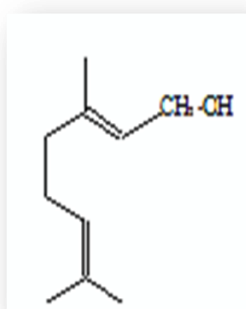


**оцимен**

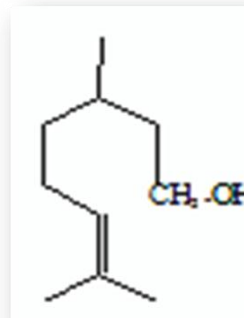
### **Алкохоли**



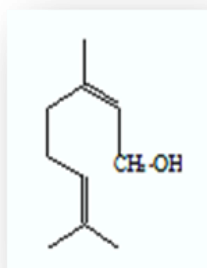
**линалоол**



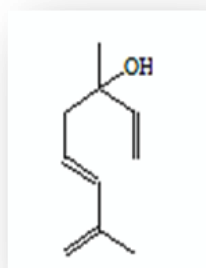
**гераниол**



**цитронелол**

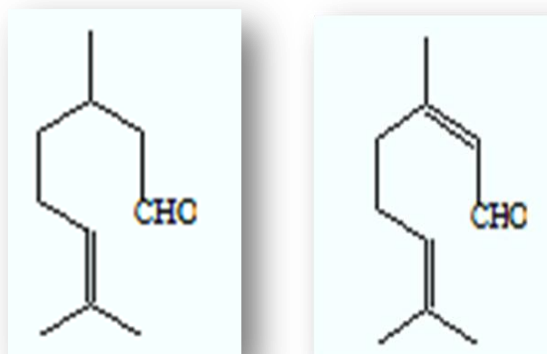


**нерол**



**хотриенол**

### Алдехиди



**Цитронелал**

**Цитрал**

Слика 4. Структурни формули на терпени (Донева-Шапчевска, 2005)

Figure 4. Structural formulas of terpenes (Донева-Шапчевска, 2005)

Најголем дел од аромите во виното се резултат на метаболизмот на квасецот за време на алкохолната ферментација. Концентрацијата на аромите во виното зависи од повеќе фактори, меѓу кои се: сортата, степенот на зрелост на грозјето, применетите агротехнички мерки, климатските услови, почвата, температурата итн. Содржината на аромите најмногу зависи од времето на мацерација и следењето на релативната содржина на алкохоли, естри и масни киселини. Покрај тоа, содржината на ароми зависи и од применетите технолошки постапки за време на производството, вклучувајќи ја должината на мацерацијата, видот на квасец што ќе се употреби, ензимот, дабовиот чипс, температурата на ферментација итн. Зреењето и стареењето на виното при различни услови и третмани, исто така влијае врз ароматичниот профил (Хорнси, 2007).

#### **1.4. Улогата и влијанието на сулфур диоксид во производната практика**

Сулфур диоксид се користи во производството на вино како основно средство за заштита од оксидација и претставува антиоксидантен агенс во виното и грозјето, главно за да спречи микробна инфекција и оксидација (Иванова-Петропулос, 2013).



Во виното  $\text{SO}_2$  се наоѓа во форма на слободен, врзан и вкупен  $\text{SO}_2$ . Вкупниот  $\text{SO}_2$  претставува збир од слободниот и врзаниот  $\text{SO}_2$ . Слободниот  $\text{SO}_2$  во помал дел се наоѓа во гасовита форма, а поголем дел е во облик на  $\text{H}_2\text{SO}_3$ -сулфуреста киселина.  $\text{SO}_2$  кога е во гасовита форма е многу активен и во мали количини делува како антисептик и антиоксидант. Доколку е присутен во поголеми количини се осеќа и преку мирис. Содржината на  $\text{SO}_2$  во гасовита форма многу зависи од pH на виното. Затоа е битно да се знае корелацијата на pH со слободниот  $\text{SO}_2$ . Врзаниот  $\text{SO}_2$  се соединува со алдехидите, шеќерите, танините и антоцијаните во виното. Слободниот  $\text{SO}_2$  е најважната форма затоа што го штити виното и има антисептички и антиоксидативни својства, додека врзаниот  $\text{SO}_2$  е неактивен и нема заштитна улога во виното. Слободниот  $\text{SO}_2$  пак е многу нестабилен, делумно испарува или се губи при преточување, мешање на вина, бистрење, стабилизирање, филтрирање. Доколку во виното има поголема количина на  $\text{SO}_2$ , тоа негативно се одразува на квалитетот, мирисот и вкусот.

### ***1.5. Влијанието на ензимите и нивната примена во производството на вино***

При мацерацијата и производството на вино, покрај квасец, се користат и други енолошки производи. Ензими и дабов чипс се производи кои многу често наоѓаат примена за време на ферментацијата на црвените вина. Ензимите најчесто се користат за подобрување на бојата и аромата кај црвеното вино (Revilla & González-San José, 2003).

**Ензими** се сложени протеини што се добиваат од живи клетки, кои пак продуцираат специфични реакции кај ширата и дејствуваат како катализатори (катализатори на биолошки процеси) (Aehle, 2007). Се користат за побрзо таложење, т.е. добивање на бистра течност, а најголема примена наоѓаат кај црвените сорти за екстракција на боја, танини и подобра комплексност кај виното, вклучувајќи стабилност и ароми (Armada, Fernández, & Falqué, 2010).

Ензимите се дефинираат како алатки на животот затоа што тие во суштина учествуваат во сите процеси во природата, на изградба и на

распаѓање. Ензимите ги забрзуваат реакциите во биолошките системи и затоа се наречени биокатализатори.

Функцијата „катализатор“ не е ограничена само на живи, т.е. витални клетки, туку ензимите може да дејствуваат и надвор од живите организми, на пример кај овошјето (сок од јаболка, праски...), грозје со сопствени ензими за време на бистрењето на ширата. Ензимите не само што се многу активни, туку се и многу специфични во реакциите. На пр. ензимот хидролаза забрзува реакции на хидролиза, естеразата забрзува реакции на естерификација, оксидазите забрзуваат реакции на оксидација. Ензимите истовремено може да се поврзат со други органски соединенија, на пример со јаглехидрати (гликопротеини). Како сите протеини, ензимите немаат долг животен век бидејќи на топлина тие брзо се денатурираат, а со тоа ја губат својата ензимска активност. За да не се изгуби ензимската активност, потребно е да се контролираат температурата и рН. Активноста на ензимите зависи и од присуство на коензими и кофактори, како што се тешките метали (Ag, Hg) или танините (Haßelbeck & Henke, 2010).

Според OIV (Меѓународната организација за лозарство и винарство), дозволени се четири ензими кои се регистрирани на позитивната листа за производството на вино. Тоа се пектиназа, бета-глюканаза, уреаза и лизозим (Haßelbeck & Henke, 2010).

Најкористени ензими за производство на вино се пектиназите, ензими што ги има во грозјето, но во мали количини, па затоа најчесто се додаваат комерцијално произведени. Пектиназите се применуваат за бистрење и филтрирање на ширата, за време на ладната мацерација и распаѓање на зрното. Кога ензим се користи во текот на мацерацијата, процесот се нарекува ензимска мацерација, а кога е потребно бистрење на ширата, процесот е ензимско бистрење. Со примена на ензим за мацерација се подобруваат бојата и аромите во ширата т.е. во виното.

### **1.6. Улогата на дабот при производството на вино**

Пред појавата на иноксните материјали за производство на вински садови (танкови) за ферментација и зреење на виното, се користеле дабови буриња и бочви, а со производството на дабова дрвесина (чипс) и додавање

при ферментација, се постигнува сличен ефект за подобрување на аромата и квалитетот на виното. Главната улога на дрвото е подобрување на интензитетот и комплетниот вкус и арома во виното, со што се намалува астригентноста и горчината, а се добива стабилност на бојата и намалување на вегетативните тревни ароми во виното (Garde Cerdán, Torrea Goñi, & Ancín Azpilicueta, 2004; Bozalongo, Carrillo, Fernández Torroba, & Tena, 2007; Macedo et al., 2008; Rayne, Sheppard, Di Bello, & Eggers, 2011).

Дабот од родот **Quercus** има околу 300 познати видови кои се поделени во две групи: црвен и бел даб. Некои видови од бел даб нашле примена за производство на буриња и алтернативни производи во винарството. Останатите типови на даб имале непогодна структура или арома и затоа не нашле поширока примена (Маргалит, 2011). Белиот даб поседува позитивни својства за правење садови за вино, а неговата традиционална примена придонела виното со специфични ароми од дабот да биде поценето.

*Quercus alba*, *Quercus robur* (*Quercus Pedunculata*) и *Quercus sessilis* се трите вида бел даб кои нашле најмногу примена во винската индустрија за ферментирање и зреење на виното (Џексон, 2013).

На сл. 5 е прикажано стебло од *Quercus alba* што се сретнува во серија од шест слични вида бел даб (*Q. Bicolor*, *Q. Lyrata*, *Q. Macrocarpa*, *Q. Muehlenbergii*, *Q. Prinus* и *Q. Stelata*) кои го даваат типот на американскиот даб, којшто се користи за изработка на буриња. Видот *Q. Alba* сочинува околу 45 % од белиот даб што се произведува во Северна и Централна Америка (Џексон, 2013).



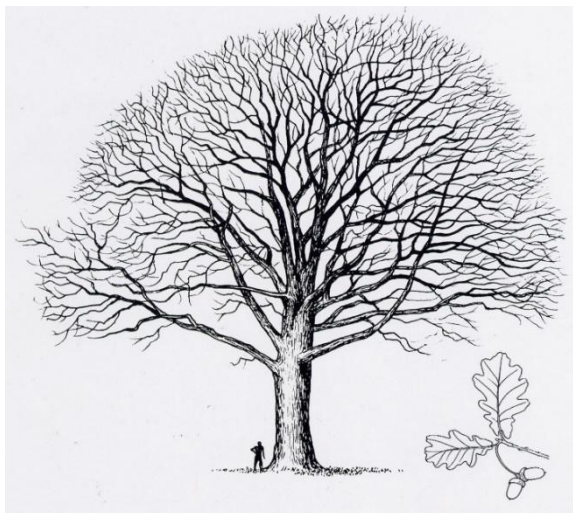
Слика 5. *Quercus Alba*

Figure 5. *Quercus Alba*

Главните европски дабови се *Quercus Robur* и *Quercus Sessilis* или познат уште како *Quercus Petraea* и се сметаат за сорти од ист вид. Европските дабови се распространети низ цела Европа, главно во Франција, Италија, Португалија, Русија, Скандинавија, Унгарија, Хрватска, а ги има и во Македонија. Различните географски региони создаваат и различни вкусови и ароми од белиот даб (Маргалит, 2011).

На сл. 6 е прикажано стебло на *Quercus Robur* кое е најраспространет вид во цела Европа. Го има и на север, а крајна северна земја каде што расте ова дрво е Шведска. *Quercus Robur* има јако стебло со голема густина и фина гранулација и е многу тешко, затоа и се вели дека е моќен вид на даб. Расте брзо, бара светлина и има тенденција за растење во ширина. Во Франција е распространет во областа Лимусин (Limousin).

Според Меѓународниот регистер на сорти за родот *Quercus* (International Cultivar Registration Authority –ICRA for the genus *Quercus*), видовите од родот *Quercus* се застапени во Р Македонија.



Слика 6. *Quercus Robur (Pedunculata)*

Figure 6. *Quercus Robur (Pedunculata)*



Слика 7. *Quercus Petraea*

Figure 7. *Quercus Petraea*

*Quercus Sessilis* или познат уште како *Q. Petraea* и *Q. Sessiliflora* се главни видови на бел даб што се користат за производство на буриња и алтернативни производи. На сл. 7 е претставено стебло од видот на *Quercus Petraea* кое се наоѓа во високи шуми населени со големи дрвја. Најмногу е застапен во централна Франција каде што му одговараат влажните терени. Има помека структура на стеблото, побавно расте и е зависно од светлина. Има помекти танини кои побавно се ослободуваат во виното.

Во производството на вино, алтернативните производи од даб имаат посебна улога, како при ферментацијата, така и при зреењето на виното. Така, една француска поговорка вели „Ако не можеме да го ставиме виното во буре, тогаш бурето ќе го ставиме во вино“. За производство на алтернативни производи, како и за буре, се користат стебла чија старост надминува од 100 до 200 години. По собирање на дрвата, следи процес на зреење или ферментација на исечените даски во однос на нивната дебелина, при што 1 cm дебелина = 1 година. Зреењето на дрвото во надворешна средина, во зависност од климатските услови, правецот на ветерот и влажноста на воздухот, може да биде од 3 до 5 години. При зреењето се одвиваат микробиолошки процеси во дрвото проследени со формирање на ароми кои што потоа го даваат карактерот на виното. На сл. 8 е даден приказ на зреење на дабовите даски во надворешни услови.



Слика 8. Дабови штици во услови на зреење

Figure 8. Oak boards under ripening conditions

Поради долгата и скапа постапка за производството на буриња, започнато е со производство на алтернативни производи од даб: иверки, чипс и пудра. Голем дел од овие производи се добиваат како остаток при изработката на бурињата. Чипсот е со големина од 2 до 5 см, а пудрата е ситна дабова струготина. Иверките се подолги и поголеми парчиња со правилни правоаголни форми. Нивната доработка (тостирање) е различна за секој производ во зависност од интензитетот и температурата на третирање.

Алтернативните производи се нагоруваат или тостираат, при што може да се добијат три основни типа производи според нагорувањето: слабо (L), средно (M) и силно (H). Штиците се спремаат и до неколку години во зависност од намената и тостирањето. Слабото тостирање (L) се одвива на температура до 70 °C и се врши само на површината од парчињата дрво. Средното тостирње (M) е поинтензивно и се врши на температура од 120 - 150 °C (сл. 9), а силното тостирање (H) е поинтензивно и е на повисока температура, од 180 - 280 °C (Jacques 2003).



Слика 9. Средно печен (M) француски чипс - *Quercus Robur*

Figure 9. Medium toasted (M) French chips - *Quercus Robur*

Основните компоненти коишто се застапани во старите дабови дрва содржат различна процентуална застапаност на следниве компоненти (Jacques, P., 2003):

- *целулоза* - застапена 40 % во дабот и е најраспространета супстанција;
- *хемицелулоза* - застапена со 20 %;
- *лигнин* - застапен со 25 % и има важна улога во еластичноста на дрвото, механичките својства како и во заштита на дрвото од вода;
- *елагитанини* - застапени со 10 % и ова се водорастворливи танини кои со хидролиза даваат елагова киселина, а која ја нема во грозјето, но ја има во дабот и од таму поминува во виното. С-глукозиден елаготанин се наоѓа во вината што се ферментирани или зреени во дабови буриња или со дабов чипс. Се добива како резултат на реакцијата на С-глукозидниот елаготанин *вескалагин* во малку кисела средина и реагира со нуклеофилна единица присутна во црвеното вино како што се етанол, катехини и епикатехини, при што се добива кондензиран хибриден производ, како што се *β-1-О-етилвескалагин* и *флавано-елагитанини* (Michaël et al., 2011);
- *микрокомпоненти* - застапени со 5 %, во кои спаѓаат: моносахариди, липиди, стероли, испарливи супстанции, ги даваат аромите на пржено, зачинето, кога се тостира дрвото;

- *минерални супстанции* – Ca, Mg, K;
- *лактони* – типични компоненти на дабот;
- *други секундарни компоненти* што се добиваат при тостирањето на дрвото, без да се изгубат аромите од него.

При апликација на дрвото во виното, односно зреење на виното во дрво, првите компоненти што се ослободуваат се растворливите соединенија кои се наоѓаат на површината од дрвото, а тие се:

- *моносахариди* што не можат да ги хидролизираат, минерални соли, фенол алдехиди како ванилин, итн.
- *фенолни киселини* кои се познати антиоксиданти поради способноста да предават водород или електрон, како и по тоа што спречуваат оксидација на различни компоненти, посебно на масните киселини и маслата. Тие имаат улога да асимилираат хранливи материи, синтеза на протеини, активност на ензимите и фотосинтеза. Се делат на деривати на циметна и хидроксibenзоева киселина. Најзастапени хидроксидеривати се ванилинска, гална, протокатехинска, сиригинска, елагова киселина. Галната киселина е компонента на галотанините. За ароматичното јадро се врзуваат и метокси групите што е случај со ванилинската киселина;
- *елаготанини* од кои може да се издвојат проантоцијани и флавоно (Michaël et al., 2011).

Со тостирањето на дабот се разложува лигнинот од дрвото за да се ослободат испарливите феноли, при што доаѓа до разложување на некои галотанини, елаготанини и полисахариди кои придонесуваат за карактеристична арома во виното (Jacques, 2003).

Со користење на алтернативни производи како што е употребата на дабов чипс, иверки или дабова пудра и ферментација во инокс танкови, се добиваат вина со помала астригентност и битерност во однос на оние вина што ферментираат во дабови буриња и бочви (Rodríguez-Bencomo, Ortega-Heras & Perez-Magarin, 2010).



Користењето на алтернативи од даб во текот на ферментацијата на црвените вина ги предизвикува следниве ефекти:

- омекнување на танините и зголемување на интензитетот и стабилноста на црвената боја, и
- екстракција на дабовите фенолни соединенија (елаготанини) и ароматични соединенија кои придонесуваат за комплексност на виното.

Ферментација и зреењето на виното во присуство на струготини од даб е технологија за производство на квалитетни вина. Во многу вински земји, дабовиот чипс наоѓа примена за зреење - стареење на виното. Примената на алтернативни производи во производството на вино доведува до подобрување на сензорните карактеристики, и тоа:

- подобрување на структурата на танините во виното;
- стабилизација на бојата;
- создавање на ароми на ванила и чад или пушено месо;
- маскирање на горчливиот вкус и непогодните танински компоненти.

### **1.7. Гасна хроматографија (GC)**

Најпогодна техника за анализа на ароми во вино и грозје е гасната хроматографија (GC). Аромите се присутни во многу ниски концентрации и затоа е неопходно и нивно концентрирање пред GC-анализата (Иванова, 2013).

Гасната хроматографија (GC) е метод на раздвојување и детекција на испарливи органски соединенија. Со оваа техника се анализира примерок во гасна фаза што го носи мобилна фаза - инертен гас. Гасови што се најчесто користени како носачи во гасната хроматографија се хелиум, азот, водород или смеса од аргон и метан. Кај оваа техника, примерокот се внесува во инјекторот каде што тој испарува на висока температура (~ 200 °C) а потоа, носен со мобилната фаза, оди во колоната каде што се врши разделувањето (Иванова, 2013). Истражувањата најчесто се насочени кон утврдување на главните ароматични компоненти кои се нарекуваат и главни испарливи соединенија, во кои спаѓаат естрите и вишите алкохоли. Анализите на овие соединенија се

рутински и за таа цел се применува гасна хроматографија (GC) со пламено-јонизациски детектор (FID – Flame Ionization Detector), а во поново време сè повеќе се користи масен детектор (MS). Во групата на испарливи соединенија во виното, а коишто може да се анализираат со гасна хроматографија, спаѓаат и други соединенија, како: терпени, алдехиди, кетони, масни киселини, сулфурни соединенија, испарливи феноли, норизопреноиди, пирозини и др. (Иванова, 2013).

Гасната хроматографија е метод за раздвојување на супстанции од гасна смеса. Хроматографскиот систем содржи две фази од кои едната е гасна и подвижна фаза, а другата е неподвижна фаза. Мобилната фаза е гас носач, а стационарната фаза може да биде течна или цврста. Основните делови на еден гасен хроматограф шематски се прикажани на слика 10:

1. сад со гас носач, со регулатор за притисок и проток;
2. инјектор (систем за внесување на примерокот);
3. колона (најчесто капиларна), поставена во печка;
4. печка;
5. детектор;
6. систем за прикажување на хроматограмите и обработка на податоците.



Слика 10. Шематски приказ на гасен хроматограф

Figure 10. Schematic view of a gas chromatograph

При внесување на примерокот во гасниот хроматограф, тој испарува и заедно со гасот носач влегува во колоната каде што минува преку стационарната фаза и се разделува на супстанциите од смесата, а така, разделените супстанции влегуваат во детекторот и се врши нивна детекција.

Гасовите носачи мора да бидат стабилни, хемиски инертни спрема анализите, со мал вискозитет, и со висок степен на чистота (99,99 %). Се чуваат во боци (40 L) под притисок од 15 MPa или 150 bar, освен CO<sub>2</sub> кој се чува под притисок од 6 MPa. Својствата на гасот носач влијаат врз ефикасноста на раздвојувањето, времето на анализата и осетливоста на детекторот и важно е тие да не се менуваат во текот на движењето низ инструментот (Иванова, 2013).

Колоните за гасна хроматографија може да бидат полнети („пакувани“) и капиларни (цевчести). Полнетите колони имаат должина од 1,5 до 10 m, а капиларните се со должина 30 m, внатрешен дијаметар 0,25 mm и 0,25  $\mu$ m дебелина на слојот од стационарната фаза.

Постојат различни видови на капиларни колони кои се разликуваат по полнењето, односно стационарната фаза која се наоѓа во внатрешноста на колоната. Стационарните фази имаат различна намена и меѓусебе се разликуваат според поларноста (од неполарни до силно поларни). Колоните за гасна хроматографија имаат облик на спирала, круг или буква U, а може да се изработени од метал, стакло или пластика. Раздвојувањето на супстанциите зависи од должината и ширината на колоната.

Колоните може да се загреваат на температура од околу 40 – 300 °C; колку е повисока температурата, и пиковите се подобри, симетрични се и остри, но сето тоа зависи од природата, т.е. испарливоста на примерокот. Во гасната хроматографија постојат неколку видови на детектори кои се разликуваат според принципот на работа, кој пак се заснова врз некоја физичка величина: топлотна спроводливост, електрична спроводливост или пламен. Така, се применуваат следниве детектори: *детектор на база на топлотна спроводливост* (TCD), *пламено-јонизациски детектор* (FID), *детектор со електронски зафат* (*детектор на база на фаќање на електрони* (ECD) и *масен спектрометар* (MS) (Иванова, 2013).

Со детекторот на база на топлотна спроводливост (TCD) се следи промената на топлотната спроводливост на гасот носач кога во него ќе се појави одредена супстанција.

Пламено-јонизацискиот детектор (FID) е еден од најосетливите детектори што се применува во гасната хроматографија. Особено е погоден за квантитативна анализа на органски соединенија, особено на јаглехидрати, соединенија кои содржат јаглерод и водород.

Детекторот со електронски зафат (ECD) се користи за детекција на атоми и молекули во гасна фаза со зафаќање на електрони, со што се менува струјата.

Масениот спектрометар е најосетлив детектор кој особено е погоден за идентификација на супстанции преку детекција на нивните маси. Има широка примена во различни области: храна и пијалаци, животна средина, лекови, пожари, идентификација на непознати примероци, криминалистика. Принципот на работа на масениот детектор е јонизација на молекулите што влегуваат во масениот спектрометар и нивна фрагментација, при што се добиваат фрагменти – јони што се детектирани од детекторот (Иванова, 2013).

Масениот спектрометар може да детектира целосно („full scan“), ги гледа сите пикови во спектарот или детектира и селектира избрани јони („selective ion monitoring“ - SIM) и гледа само селектирани јони на специфични супстанции.

Најчесто применуваните масени спектрометри кои се поврзуваат со гасен хроматограф се: квадрупол (MS), троен квадрупол (MS-MS), детектор со јонска замка (ion-trap), со време на прелетување (TOF-MS).

На сл. 11 е прикажан гасен хроматограф со пламено-јонизациски детектор, а додека на сл. 12 е даден гасен хроматограф со масен спектрометар (Иванова, 2013).

## Гасен хроматограф



Слика 11. GC – FID инструмент и печка за колона  
Figure 11. GC - FID instrument and column oven



Слика 12. GC-MS инструмент  
Figure 12. GC-MS instrument

Анализа на испарливи компоненти во грозје и вино најчесто се врши со гасна хроматографија, и тоа, најчесто со масен детектор за квалитативна и

квантитативна карактеризација на испарливите компоненти во примероците. Всушност, GC-MS претставува една од најдобрите и најосетливи техники за идентификација на ароми во примероци од различна природа, особено за супстанции присутни во многу ниски концентрации (Verzera et al., 2008; Andujar-Ortiz et al., 2009; Tang et al., 2011; Ivanova et al., 2012, 2014). Освен тоа, GC-MS е погодна и за квантификација на ароми, при што се користи поларна колона за разделување на супстанциите (аромите). Бидејќи аромите се присутни во ниски концентрации во виното, потребно е тие да бидат концентрирани/екстрахирани пред анализата со GC-MS. За таа цел се применуваат различни методи, како што се: цврсто-фазна екстракција (SPE), цврсто-фазна микроекстракција (SPME), стир-бар сорпциона екстракција (SBSA) или течно-течна екстракција со примена на органски растворувачи. Течно-течната екстракција на ароми се врши со дихлорометан, а добиениот екстракт, по центрифугирање, т.е. по одделување на органската фаза, се испарува до суво со ротоевапоратор или со струја од азот. Мал волумен од екстрактот (1  $\mu\text{L}$ ) се внесува во GC-MS инструментот каде што разделувањето на компонентите се врши со поларна колона.

Во едно истражување за анализа на испарливи соединенија во македонските вина (Ivanova et al., 2013), применети се следниве работни услови за разделување на ароми со GC-MS: температура на инјектор 240 °C, температура на MS-изворот 230 °C, температура на MS Quad 150 °C, и температура на трансфер линијата 280 °C. Раздвојувањето на компонентите е извршено со следнава температурна програма: почетна температура 40 °C, која потоа се зголемува до 180 °C, со брзина од 3 °C/min. Потоа, температурата се зголемува до 260 °C со 20 °C/min и оваа вредност се одржува 10 min. Гасот носач е хелиум, со брзина од 1,5 mL/min. Скенирањето на компонентите се врши во опсег на маси од 50 до 400 m/z, со брзина од 1 scan/sec.

## 2. ПРЕГЛЕД НА ЛИТЕРАТУРАТА

Постојат многу анализи и трудови за ароматски профил на црвени вина, но за виното Вранец досега е објавена само една целосна студија (Ivanova et al., 2014). Оваа студија е дел од оваа магистерска работа, во која за првпат се проучувани содржините на ароматични соединенија во вина Вранец, произведени со различно време на мацерација, во присуство на енолошки средства, ензим и дабов чипс. Влијанието на различните енолошки постапки, додавањето на ензим и дабов чипс во гроздовата каша за време на ферментацијата ја збогатуваат содржината на ароматични соединенија во виното. Со тоа се оформува еден ароматски профил за сортата Вранец и која од технолошките постапки дава најбогата содржина на ароматски профили да се применува за подобрување на неговиот квалитет. Виното Вранец од Македонија, покрај интензивната боја се карактеризира и со богат ароматски профил кој се должи на својствата на сортата, но и на погодните агроеколошки услови.

Ароматичните соединенија се определени во комерцијални македонски вина во студијата објавена од Иванова со соработниците (2013). Претходно, разработен и валидиран е метод за анализа на ароми во црвено вино (Ivanova et al., 2012a) со примена на течно-течна екстракција и гасна хроматографија поврзана со масен детектор.

Според Хуан Хозе Родригез-Бенкомо (Juan José Rodriguez-Bencomo) и соработниците (2010), различниот степен на тостираност на чипсот влијае врз ароматскиот комплекс на виното. Вината ферментирани со нетостиран чипс имаат поголема содржина на испарливи ароматични компоненти во однос на контролните вина (без чипс). Во присуство на чипс во текот на ферментација, зголемено е формирање на 2-фенилетанол, изоамил алкохол, киселини, етил естри. Значајни разлики помеѓу контролните вина и вината ферментирани со чипс во однос на содржината на ароматични соединенија е утврдена по 6 месеци зреење во шишиња. Вината што се ферментирани со чипс, при сензорно оценување покажале најмногу овошни ноти, за разлика од оние што зреееле во присуство на вински талог, каде што има и редуктивни ноти.

Во трудот „Ефектот на алтернативната техника на стареење на талог и примената на нетостиран дабов чипс во алкохолната ферментација врз ароматскиот состав на црвени вина“ од авторот Rodríguez-Bencoso и соработниците (2010), применети се различни енолошки третмани на црвено вино: стареење на талог со и без додавање на ензим  $\beta$ -глюканаза; употреба на комерцијален квасец со и без ензим  $b$ -глюканаза; употреба на нетостиран чипс во ферментацијата, при што се утврдени различни енолошки ефекти на испарливите компоненти. Присуството на чипс за време на ферментацијата позитивно влијае врз формирањето на поголеми содржини на 2-фенилетанол, етил естри и етил ацетат, но негативно влијае врз нивото на некои лактони и испарливи феноли. Било утврдено дека винскиот талог и комерцијалниот квасец можат да се врзат за некои од испарливи соединенија, главно етил естри и етил ацетат. По шест месеци зреење на виното во шишиња, биле забележани разлики помеѓу контролното вино и виното ферментирано со чипс, додека, незначителен ефект бил забележан со примената на ензим  $\beta$ -глюканаза.

Herjavec и Majdak (2002), во своја студија примениле мацерација од 3 часа на комиње од сортата траминец, користејќи при тоа пектолитички ензим и мацерација без ензим. Биле утврдени разлики во вината во однос на содржината и составот на испарливите компоненти, но и разлики добиени при сензорната анализа на вината. Сензорната и хемиската анализа биле направени по завршување на ферментацијата и по 12 месеци зреење на виното во шишиња. Вината добиени со мацерација на грозјето со додаток на пектолитички ензим содржеле најголема концентрација на етил ацетат, ацетати на виши алкохоли и етил естри на масни киселини и најниска концентрација на вкупни виши алкохоли. Разлики во концентрацијата на етил лактат и диетил сукцинат помеѓу сите третмани не биле забележани. По зреењето на вината во шише, не биле утврдени промени во концентрацијата на вишите алкохоли, било забележано намалување на содржината на ацетатите на вишите алкохоли и етил естрите на масните киселини, како и зголемување на концентрацијата на етил лактат и диетил сукцинат. Најдобро биле оценети вината добиени со мацерација во присуство на пектолитички ензим, додека вината без ензим биле со послаб квалитет.



Виланова (Vilanova) и соработниците (2010) во своето истражување направиле опис на некоку примероци вина. За опишување на вкусот на шпанското вино алабрино биле земени вкупно 35 примероци од пет географски области со контролирано потекло (Denomination of origin), од регионот Риас Баихас, во северозападна Шпанија. Биле извршени сензорни описни анализи и инструментална анализа со GC. Целта била да се утврди корелацијата помеѓу инструменталната анализа и сензорната перцепција на компонентите на виното. Соединенија што најчесто придонесуваат за вкусот на албарино вината биле оние поврзани со овошни ароми (етил ацетат и други етил естер) и со цветни ароми (монотерпени). При сензорната анализа биле добиени дескриптори со највисока геометриска средина за цветните и овошните ароми (цитруси, цветни, овошни, зрели плодови, јаболка, тропски).

Перес-Коељо (Pérez-Coello) со соработниците (2000) проучувале вина зреени или ферментирани во дабови буриња или во присуство на дабов чипс, при што е утврдено дека вината содржат супстанции што потекнуваат од дрвото, како што е некој фурански дериват (фурфурал, 5-хидроксиметилфурфурал) и фенолни и цинамалдехиди, со ванила која покажува најголемо влијание врз аромата во виното. Фурфурол и ванилин се метаболизираат со помош на квасецот за време на ферментацијата во присуство на дабов чипс.

### 3. ЦЕЛ НА ИСТРАЖУВАЊЕТО

Технологијата за производство на црвено вино се разликува од технологијата за производство на бело вино. Алкохолната ферментација кај белите вина се одвива само во сокот, т.е. ширата од грозјето, додека кај црвените вина, секогаш гроздовата каша ферментира заедно со тврдите делови од гроздот, т.е. со лушпите, мезокарпот и семките. Со мацерирање на гроздовата каша во виното, се формираат хемиски супстанции што го подобруваат квалитетот на виното.

Мацерацијата е многу важна постапка во производството на висококвалитетни црвени вина што доведува до зголемување на стабилноста на бојата, подобрување на вкусот и аромата, односно целокупниот квалитет на виното. Во текот на мацерацијата се случуваат и формираат низа хемиски промени, а содржината на аромите се зголемува како резултат на екстракција на ароматичните компоненти од лушпата на зрното. Од друга страна пак, при мацерација на гроздовата каша, алкохолната ферментација се одвива со примена на селектирани квасци, при што се создаваат голем број испарливи соединенија во виното. Во првите 2-3 дена од ферментацијата, во ширата се присутни и не - *Saccharomyces cerevisiae* квасци, кои се со помала осетливост на алкохол, а по извесен период нив ги заменува квасецот *Saccharomyces cerevisiae*, кој е доминантен до крајот на ферментацијата. Квасците од родот *Saccharomyces cerevisiae* со неговите вариетети произведуваат широк спектар на испарливи и неиспарливи соединенија кои го формираат квалитетот на виното (Romano et al. 2003).

Значаен фактор во производство на квалитетни црвени вина е должината на мацерација која влијае врз стабилноста на бојата, мирисот и вкусот на виното. Во текот на мацерацијата, содржината на ароматични соединенија се зголемува како резултат на нивната екстракција од грозјето. Од друга страна, истовремено со мацерацијата се одвива и алкохолната ферментација под дејство на квасецот, при што се формираат нови испарливи соединенија, со што се создаваат нови суптилни ароми, карактеристични за дадена сорта.

Затоа, целта на истражувањето во овој магистерски труд е да се произведе вино од сортата Вранец што е најраспространетата и најзначајна сорта во Македонија, за да се добие квалитено и препознатливо вино кое ќе изобилува со испарливи ароматични соединенија. Истражувачката работа ги вклучува следниве активности:

- 1) Избор на суровина, т.е. грозје од сортата Вранец. Грозјето е берено при оптимална зрелост, од типичен микрорегион од Тиквешкото Виногорје (с. Вешје).
- 2) Производство на вино со примена на мацерација во период од 4, 7, 14 и 30 дена, со цел да се провери влијанието на должината на мацерацијата врз ароматниот профил, како и врз содржината на ароми.  
Производство на вино со употреба на енолошки производи: ензим и дабов чипс, со цел да се провери нивното влијание врз ароматниот профил на вината.
- 3) Анализа на ароматичните соединенија со примена на техниката HS-SPM-GC-MS со цел идентификација и квантификација на различни групи на ароми, вклучувајќи алкохоли, естри, масни киселини, алдехиди, кетони, сулфурни и други соединенија.
- 4) Статистичка анализа на податоците применувајќи: (1) ANOVA (тест Student–Newman–Keuls) за споредба на средни вредности со цел да се провери дали постојат статистички значајни разлики за секоја ароматична компонента во проучуваните вина; (2) карактеристична векторска анализа (Principle Component Analysis, PCA) со цел да се провери дали има групирање меѓу вината.

Во ова истражување, за првпат е извршена идентификација и карактеризација на ароматични соединенија во локална македонска сорта Вранец. Резултатите од истражувањето треба да имаат голем придонес во утврдување на технолошка постапка со која се произведува вино Вранец со комплексен ароматичен профил.

## **4. МАТЕРИЈАЛИ И МЕТОДИ НА ИСТРАЖУВАЧКАТА РАБОТА**

### **4.1. Грозје**

Грозјето од сортата Вранец е предмет на истражување во оваа магистерска работа. Грозјето е одгледувано и набрано од микролокалитетот Орле, во атарот на с. Вешје во Тиквешкото Виногорје. Лозовиот насад е во сопственост на АД Венец од с. Долни Дисан кој се наоѓа на надморска височина од 560 до 580 m. Големината на насадот е 6 ha со меѓуредово растојание од 2,4 m, а растојанието меѓу лозите во редот е 0,90 m. Насадот е подигнат во 2001 година со примена на шпалирен систем на одгледување. При резидба се применува двокраков Гиов начин. Почвата е слабо карбонатна и нема услови за наводнување. Приносот на грозје е максимално 12 000 kg/ha.

### **4.2. Производство на вино**

Бербата на грозје е извршена на ден 11 октомври 2010 година, кога е постигната оптимална зрелост од 22.1 °Brix. Гмечењето на 450 kg грозје и издвојувањето на гроздинките е извршено со помош на мала електрична иноксна гроздомелачка. За заштита од оксидација, во гроздовата каша е додадена 5 %  $H_2SO_3$  (сулфуреста киселина). Гроздовата каша е поделена во три одделни пластични садови по 150 kg, поединечно. Пластичните садови се со зафатнина од 200 L. Во сатовите, најпрво е додаден сув мраз ( $CO_2$ ), а потоа се наполнети со гроздова каша, на температура од 15 °C. Првиот сад представува контрола (K). Во вториот сад (E) се додава ензим пектиназа Lallzyme EX-V ( класифицирани како Xn R42, со број EL016-22-40, произведени во Lallemand, Corporate -Montreal, Canada) во доза од 2 g/100 kg грозје; и во третиот сад (ДЧ) се додава 2 g/L француски чипс средно печен (MT FO) произведен во Erbslöh Geisenheim, Germany. За правилен тек на алкохолната ферментација, во сите три сада беше засеано селектиониран вински квасец од родот на *Saccharomyces cerevisiae* (Lallemand Lalvin ICV D-254) во доза од 25 g/hL, како и протектант за рехидратација на квасецот Go-ferm protect во доза од 25 g/hL.

По додавањето на SO<sub>2</sub>, квасец, ензим и дабов чипс, гроздовата каша беше мацерирана за отпочнување на алкохолната ферментација. Во текот на алкохолната ферментација, во сите три сада, екстракцијата и мацерацијата на гроздовата каша се изведуваше со механичко потопување на комињето. Температурата беше одржувана на 25 °C. За анализа, од сите три сада (К, Е и ДЧ), беше земено еднаков волумен на вино (5 L), и тоа по 4-тиот, 7-миот, 14-тиот и 30-тиот ден од мацерација. Виното е ставено во стаклени садови, добивајќи при тоа вкупно 12 примероци за анализа. Младото вино беше стабилизирано на температура од -15 °C, во период од три дена, за да се исталожат тартаратите, а потоа е ставено во шишиња и чувано на температура од 6 до 8 °C пред анализата.

Анализата на аромите е извршена по една година зреење на виното. Ознаките на анализираните вина се прикажани во табела 1.

**Табела 1. Ознаки на вина од сортата Вранец произведени со различни енолошки постапки**

**Table 1. Labels of Vranec wine samples produced under different vinifications**

Денови на ферментација	1	2	3
	Контрола (К)	Вино со ензим (Е)	Вино со дабов чипс (ДЧ)
4	4д - К	4д – Е	4д - ДЧ
7	7д - К	7д – Е	7д - ДЧ
14	14д - К	14д – Е	14д - ДЧ
30	30д - К	30д – Е	30д - ДЧ

#### **4.3. Определување на основни хемиски параметри**

За да се утврди квалитетот на грозјето и виното беа определени основните хемиски параметри. На грозјето се направени следниве хемиски анализи:

Определување на:

- вкупни киселини (OIV-MA-F1-05),

- pH (OIV-MA-AS313-15) и
- редуцирачки шеќери.

Додека пак, за виното се определени следниве параметри:

- алокохол,
- SO<sub>2</sub> (OIV-MA-F1-07),
- pH (OIV-MA-AS313-15),
- вкупни киселини ((OIV-MA-F1-05),
- испарливи киселини (OIV-MA-AS313-02).

#### **4.3.1. Вкупни киселини**

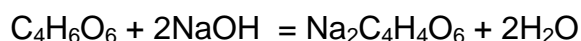
Вкупните киселини во ширата и младото виното се важен параметар за квалитетот на виното. Виното содржи органски киселини, главно винска, јаболкова, млечна, оцетна, лимонска и килибарна киселина. Доминантна киселина е винската и добиените резултати се изразуваат во g/L винска киселина (Иванова, 2013).

Определувањето на вкупните киселини се врши со неутрализација на сите киселини во виното до нивните кисели соли, при титрација со раствор од 0,1 М NaOH, во присуство на индикатор бромтимол сино. Врз основа на потрошениот волумен, по титрацијата се пресметува содржината на вкупни киселини. Вкупните киселини се изразуваат преку еквиваленти на винска киселина, како доминантна киселина во виното, изразени во g/L.

За определување на вкупни киселини, како индикатор може да се користи лакмусова хартија или раствор од бромтимол сино.

*Постапка на определување.* Волумен од 25 mL вино е префрлен во стаклена лабораториска чаша и е титриран со стандарден раствор од NaOH со концентрација од 0,1 mol/L. По завршување на титрацијата, отчитан е потрошениот волумен од NaOH и концентрацијата на вкупни киселини е пресметана.

Равенката на пресметување на вкупни киселини се добива на следниов начин:



$$n(\text{C}_4\text{H}_6\text{O}_6)/n(\text{NaOH}) = \frac{1}{2}$$

$$2n(\text{C}_4\text{H}_6\text{O}_6) = n(\text{NaOH})$$

$$2m/M(\text{C}_4\text{H}_6\text{O}_6) = V(\text{NaOH}) \cdot c(\text{NaOH})$$

$$m(\text{C}_4\text{H}_6\text{O}_6) = V(\text{NaOH}) \cdot c(\text{NaOH}) \cdot M(\text{C}_4\text{H}_6\text{O}_6)/2 \cdot V(\text{вино}) \text{ (Иванова, 2013).}$$

Пресметувањето се врши на следниов начин:

$$\text{вкупни киселини/g/L} = 7,5 \text{ mL} \cdot 0,25 \text{ mol/L} \cdot 150 \text{ g/mol} / 2 \cdot 25 \text{ mL}$$

$$\text{вкупни киселини/g/L} = 7,5 \text{ mL} \cdot 0,75 \text{ g}$$

$$\text{вкупни киселини/g/L} = 7,5 \cdot 0,75$$

$$\text{вкупни киселини} = 5,6 \text{ g/L}$$

$$\text{вкупни киселини/mg/L} = V(\text{NaOH}) \cdot 0,75$$

#### 4.3.2. pH

*pH* е мерка за концентрацијата на водородните јони во раствор и се дефинира како негативен декаден логаритам од концентрацијата на водородните јони.

$$\text{pH} = -\log [\text{H}^+]/\text{mol/L}$$

*pH* е важен параметар за квалитетот на виното бидејќи има влијание врз вкусот, микробиолошката стабилност, оксидацијата, бојата, стабилноста на  $\text{SO}_2$ , аромата и хемиската стабилност на виното. Вина што имаат повисока вредност на *pH* се повеќе склони на оксидативно и микробиолошко расипување во однос на вина со пониска вредност на *pH*. Кај црвените вина, *pH* се смета за еден од најважните параметри што го определува квалитетот на виното.

Определувањето на *pH* се врши со *pH*-метар, кој треба да биде калибриран пред анализата. Грешка при определувањето може да се настане со неправилна калибрација на *pH*-метарот, истрошена или несензитивна електрода. Температурата игра важна улога при изведување на калибрацијата со стандардни пуфери, како и при анализа на примероците.

Определувањето на *pH* во ова истражување беше извршено со *pH*-метар (METTLER TOLEDO SevenEasy), кој претходно беше калибриран со пуфери со точна вредност на *pH* (4 и 7).

#### *Постапка на определување.*

Потребни материјали за работа:

- рН-метар и електрода,
- стаклени чашки од 50 mL,
- магнетна мешалка.

Хемикалии:

- пуфер со рН 7.00, и со рН 4.00,
- шира/вино,
- дестилирана вода.

Најпрво рН-метарот треба да биде калибриран со двата пуфера. Секогаш кога инструментот ќе биде исклучен и пред употреба, задолжително треба биде калибриран. Се калибрира прво со рН 7. Во чашка со пуфер рН 7 се потопува електродата, се чека да се постигне стабилна вредност и се очитува вредноста на рН, па се меморира вредноста. Потоа, електродата се плакне со дестилирана вода, се брише и се потопува во пуфер со рН 4. Откако ќе се постигне стабилна вредност, се очитува вредноста на рН.

За определување на рН на вино, 25 mL вино беше ставено во чаша, а потоа, електродата беше потопена во виното, по што следуваше отчитување на вредноста на примерокот.

#### **4.3.3. Сулфур диоксид ( $\text{SO}_2$ )**

Определувањето на слободен и вкупен  $\text{SO}_2$  беше извршено со волуметриски метод (титрација), според методот на Ripper (Иванова, 2013). За титрирање беше користен стандарден раствор од јод со концентрација 0,01 mol/L, во присуство на 1 % раствор на скроб како индикатор. Со пипета се зема 50 mL вино, се додава во ерленмаер од 300 mL, а потоа се додава 25 mL 1 M NaOH (натриум хидроксид) со цел да се ослободи врзаниот  $\text{SO}_2$ . Ерленмаерот се затвора со затворувач и се остава 10 min да стои на темно, за да настане хидролиза и ослободување на врзаниот  $\text{SO}_2$ . Потоа, се додава 15 mL 25 % сулфурна киселина и 2 - 3 mL индикатор (скроб). Се титрира со 0,01 mol/L раствор од јод со благо мешање на ерленмаерот, до појава на темносина боја.



Се отчитува потрошениот волумен од растворот на јод и се пресметува концентрацијата на слободен и/или вкупен сулфур диоксид според следнава равенка:

$$\text{вкупен SO}_2/\text{mg/L} = V(\text{I}_2) \cdot c(\text{I}_2) \cdot M(\text{SO}_2) \cdot 1\,000/V(\text{вино})$$

Пример:

$$\text{вкупен SO}_2/\text{mg/L} = 0,01 \text{ L} \cdot 0,01 \text{ mol/L} \cdot 64 \text{ g/mol} / 0,05 \text{ L}$$

$$\text{вкупен SO}_2/\text{mg/L} = 0,128 \text{ g/L} \cdot 1\,000 = 128 \text{ mg/L}$$

$$V(\text{I}_2) = 10 \text{ mL} = 0,01 \text{ L}$$

$$c(\text{I}_2) = 0,01 \text{ mol/L}$$

$$V(\text{вино}) = 50 \text{ mL} = 0,05 \text{ L}$$

#### **4.3.4. Алкохол во виното**

Алкохолот е една од најважните состојки во виното што се создава за време на ферментацијата на шеќерите. Неговата содржина зависи од количеството на шеќери во грозјето, како и од активноста на квасците. Содржината на етанол во вината се движи во граници од 10 до 15 %. Кога се знае содржината на шеќер во грозјето, може да се пресмета и содржината на алкохол што се очекува да се создаде во текот на алкохолната ферментација.

За определување на алкохол во вино постојат повеќе методи кои се разликуваат по брзината на работа и точноста на добиените резултати. Така, етанолот може да се определи со ебулиометар, со дестилација и со мерење на густината на дестилат добиен со вриење на вино во присуство на база, како и со гасна хроматографија.

Определување на алкохолот со ебулиометар е чест метод што се применува во винарските визби. Ова е брз и практичен метод за следење на квалитетот на виното и промените на алкохолот во текот на ферментацијата, а добиените резултати се приближно точни, со мали отстапувања. Резултатите што се добиваат со ебулиометар отстапуваат за околу 0,2 %. Определувањето на алкохол со ебулиометар се врши на принцип на разликата помеѓу температурите на вриење на водата и на виното. Вина со повисока содржина на алкохол имаат пониска температура на вриење, и обратно. Но, врз температурата на вриење на виното влијаат и други присутни компоненти, како

што се киселини, глицерол, минерални материи и шеќер. Нивното влијание е многу мало во однос на влијанието на алкохолот и водата, при што ебулиометарот покажува извесни отстапувања во однос на другите методи за 0,1 до 0,2 % во однос на вистинската содржина. За определување на алкохол се користат два вида ебулиометар: Малиганов и Салеронов, кои работат на ист принцип, а се разликуваат по конструкцијата и обликот на нивните делови. Во нашиов случај е користен Малиганов ебулиометар.

#### **4.3.5. Испарливи киселини**

Испарливите киселини во виното потекнуваат од нижите масни киселини, како што се мравска, оцетна, бутерна и др. Од вкупната содржина на испарливи киселини во виното, 95 - 98 % ѝ припаѓа на оцетната киселина, затоа и се изразуваат како g/L оцетна киселина. Вината со висока содржина на испарливи киселини се склони кон расипување. Најчесто, испарливите киселини се одделуваат од виното со дестилација со водна пара, а потоа дестилатот се неутрализира со раствор од 0,1 M NaOH, со титрација и фенолфталеин како индикатор. Потрошениот волумен на базата се множи по константа и се пресметува содржината на испарливите киселини. Бидејќи оцетната киселина побавно испарува од алкохолот и водата, дестилацијата се одвива со струја од водна пара, со што се овозможува премининување на целата оцетна киселина од виното во дестилатот. Во ова истражување е користен апарат за определување на испарливи киселини VOLA 2000, Dujardin-Saleron, Франција чијашто дестилација се одвива со водна пара за време од 8 минути.

#### **4.3.6. Шеќер во грозјето**

Содржината на шеќерот во грозјето вранец е определена со Широмер со °Oe (екслови) степени (Mustimètre Dujardin – Salleron France) на скала од -10 до + 130°O и скала за температура од 0 до 35 °C. За определувањето, ширата се става во цилиндар од 500 mL, се потопува широмерот во течноста и се отчитува на скалата колку екслови степени има примерокот.

#### **4.4. *Определување на ароми со примена на гасна хроматографија поврзана со масен детектор и со headspace цврсто-фазна микроекстракција (HS-SPME-GC-MS).***

Гасната хроматографија (GC) е најдобрата и најпогодна техника за анализа на аромите во грозје и вино. Супстанцииите одговорни за аромите во грозјето и виното се присутни во многу ниски концентрации и затоа неопходно е и нивно концентрирање пред GC-анализата. За подготовка на примерокот за концентрирање се користат различни техники за екстракција: цврсто-фазна екстракција (SPE), цврсто-фазна микроекстракција (SPME), стир-бар сорптивна екстракција и течно-течна екстракција со примена на различни органски растворувачи.

Цврсто-фазната микроекстракција поврзана со автоматскиот *headspace* (HS-SPME) во комбинација со гасна хроматографија и масен детектор (GC-MS) е најефикасна техника за одделување, екстракција и сепарација на ароматични соединенија во виното. Оваа техника веќе е применета од страна на некои автори (Barros et al. 2012 ). Во овој магистерски труд, HS-SPME се користи за екстракција и концентрирање на испарливите соединенија од испитуваните примероци на вино, проследено со GC-MS-анализа на ароматичните соединенија. За оваа анализа, волумен од 500  $\mu\text{L}$  вино е префрлен во шишенце (20 mL) и пред да се затвори шишенцето, се воведува азот за да се спречи оксидација на примерокот.

Екстракцијата на аромите беше извршена со примена на следново SPME-vlakно: DVB/Carboxen/PDMS 50/30, 2 cm стабилен Flex (Supelco, Bellfonte, USA), погодно за испарливи и полуиспарливи соединенија. Земањето на примерокот беше изведено со користење на автоматски автосемплер (CTC Combi PAL, Швајцарија). Пред екстракција на испарливите компоненти, примероците беа ставени во печка за изедначување на температурата на автосемплерот на 40 °C, за 5 минути. Примероците се мешаа добро со користење на стаклено обложена магнетна мешалка. Влакната за SPME беа изложени во просторот за примероци 20 минути на температура од 40° C. Веднаш по изложеноста на влакната, тие автоматски беа префрлени во GC-инјектор за термодесорпција на 270 °C.

Сите GC-MS-анализи беа извршени на систем од производителот Agilent (GC 7890, MS 5975с, VL MSD) со користење на аналитичка капиларна колона со мала поларност (HP5MS, 30\*0,25 mm\*1µm, Agilent Technologies). Применета е следнава температурна програма: -10 °C за 1 min со температурен праг од 8 °C min<sup>-1</sup> до 270 °C (време на чекање 1 min). Беше воведен течен азот во хроматографската печка за да ја постигне почетната температура од -10 °C, со цел да се постигне висока резолуција на соединенијата со висока испарливост. Селективната детекција на маси е направена во скенирачки мод (20 - 300 amu, EI (70 eV), температура на детектор 230 °C).

Идентификацијата на испарливите соединенија беше извршена врз основа на споредба на добиените масените спектри со масените спектри од литературата и MS-бази на податоци, како и врз основа на пресметката на линеарните ретенциони индекси (LRI) според Farkas и сор. (1994). Пресметаните LRI се споредени со линеарните ретенциони индекси од база на податоци (SKAF Flavour). За идентификација на делумно преклопените јонски пикови беа користени GC-MS екстрахирани јонски хроматограми (EIC). Релативната содржина на секое од идентификуваните испарливи соединенија е пресметана преку површината на пикот на поединечните соединенија во екстрахираниот јонски хроматограм.

#### **4.5. Статистичка анализа**

Секое вино беше анализирано во четири повторувања. Резултатите беа статистички третиран и пресметани се средна вредност, стандардна девијација (SD) и релативна стандардна девијација (RSD). Покрај тоа, на резултатите е применет и ANOVA-тест, Student–Newman–Keuls за повеќекратни споредби на средните вредности за да се утврдат можните значителни разлики за секое соединение. За оваа анализа, користен е софтвер GraphPad InStat Software (верзија 3.05, САД). Значајна разлика беше статистички разгледана на ниво на  $p < 0,05$ . Карактеристична векторска анализа беше применета со цел да се провери дали има групирање на вината вранец произведени со различни енолошки постапки, како и да се идентификуваат соединенијата што се одговорни за тоа групирање. Карактеристичната векторска анализа е извршена со софтвер TANAGRA 1.4.28 (Лион, Франција).

## 5. РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЈА

Во оваа магистерска работа беше произведено вино од сортата Вранец. Оваа сорта е најзастапена, не само во Тиквешкото Виногорје, туку доминира во сите виногорја во Македонија. Беа произведени вина со примена на различни технолошки постапки, вклучувајќи различно време на мацерација (4, 7, 14 и 30 дена) и примена на енолошки додатоци, како што се ензим и дабов чипс во текот на ферментацијата. Најпрво, беа определени основните хемиски параметри, вклучувајќи: алкохол, pH, вкупни киселини, испарливи киселини, слободен SO<sub>2</sub>, вкупен SO<sub>2</sub> и редуцирачки шеќер прикажани во табела 2.

Вината потоа беа анализирани со гасна хроматографија поврзана со масен детектор (GC-MS), како најдобра техника за анализа на испарливи соединенија, и беше определен ароматскиот профил.

### 5.1. Основни хемиски анализи

Табела 2 ги содржи основните хемиски параметри во вината Вранец. Содржината на алкохол во вината се движи во граници од 14,15 до 14,45 %, v/v, што е во рамки на дозволените граници до 20 % за вина од регионот C III b (Reg. CE 606/2009). Во однос на времето на мацерација, најголема содржина на алкохол е измерена во вината мацерирани 4 дена, а најниска во вината мацерирани 30 дена. Со зголемување на мацерацијата се намалува содржината на алкохол, што беше во линерна корелација со содржината на редуцирачки шеќер, која исто така се намалува од четвртиот до триесеттиот ден. Сите вина се суви вина, со редуцирачки шеќери од 1,2 до 4 g/L, што укажува на фактот дека целосно завршила алкохолната ферментација.

Сите вина имаат висока содржина на вкупни киселини, во граници од 5,8 до 6,4 g/L, што всушност е карактеристика на оваа сорта и е во согласност со претходни истражувања за сортата Вранец, во Македонија (Ivanova-Petropulos et al., 2015, 2016), но и на Балканот (Rajković, Sredović 2009; Košmerl et al., 2013). Високата киселост е погодна за стабилизација и зреење на вината, им дава свежина на вината и ги штити вината од микробиолошко расипување. Вредноста на pH на вината е во граници од 3,38 до 3,5.

Табела 2. Основни хемиски параметри за квалитет на вината

Table 2. Basic chemical parameters for quality of the wines

Вина	Алкохол (%)	pH	Вкупни киселини (g/L)	Испарливи киселини (g/L)	Слободен SO <sub>2</sub> (mg/L)	Вкупен SO <sub>2</sub> (mg/L)	Редуцирачки шеќери (g/L)
<b>4д-К</b>	14,45	3,5	6,4	0,48	42,24	81,92	4,0
<b>4д-Е</b>	14,4	3,42	6,0	0,41	37,12	78,08	3,8
<b>4д-ДЧ</b>	14,45	3,48	6,1	0,43	35,84	76,8	3,2
<b>7д-К</b>	14,35	3,44	6,1	0,45	38,4	76,8	2,8
<b>7д-Е</b>	14,3	3,45	6,3	0,47	35,84	81,92	2,4
<b>7д-ДЧ</b>	14,35	3,42	6,2	0,48	37,12	78,08	2,5
<b>14д-К</b>	14,25	3,48	6,2	0,41	37,12	83,2	2,1
<b>14д-Е</b>	14,3	3,42	6,0	0,42	35,84	81,92	2
<b>14д-ДЧ</b>	14,3	3,46	6,1	0,44	38,4	76,08	1,2
<b>30д-К</b>	14,15	3,43	6,0	0,46	38,4	76,8	2,0
<b>30д-Е</b>	14,25	3,38	5,9	0,49	35,84	81,92	1,8
<b>30д-ДЧ</b>	14,2	3,42	5,8	0,48	37,12	78,08	1,2
<b>Min</b>	14,15	3,38	5,8	0,41	35,84	76,08	1,2
<b>Max</b>	14,45	3,5	6,4	0,49	42,24	83,2	4
<b>Average</b>	14,31	3,44	6,09	0,45	37,44	79,30	2,42

Кратенки: д – денови; К – контрола; Е – ензим; ДЧ – дабов чипс

Сите вина имаат релативно ниска содржина на испарливи киселини која се движи во граници од 0,41 до 0,49 g/L и не предизвикува негативен ефект врз сензорните карактеристики. Сите вина се заштитетни од оксидација со додадениот SO<sub>2</sub>, при што, слободниот SO<sub>2</sub> што го штити виното од микробиолошка оксидација е во граници од 35,84 до 42,24 mg/L, а содржината на вкупен SO<sub>2</sub> се движи од 76,98 до 83,2 mg/L.

## 5.2. Хроматографски анализи

Со гасна хроматографија беа детектирани вкупно 63 поединечни ароматични соединенија во анализираните вина. Дел од испарливите соединенија се претходно идентификувани во други вина од сортата Вранец (Ivanova et al., 2012a), но поголем број од нив беа идентификувани за првпат во ова истражување.

Беше утврдено дека вината имаат сложен ароматски профил, при што беа утврдени неколку фамилии на испарливи соединенија, вклучувајќи: алкохоли, естри, масни киселини, алдехиди, кетони, сулфурни соединенија и други соединенија. Идентификуваните соединенија се групирани во хемиски групи и се прикажани во табела 3. На сл. 13 е прикажан вкупен јонски хроматограм на испарливите соединенија детектирани во вино Вранец (7д-К).

За квантитативни цели беше пресметана релативната содржина на сите 63 испарливи соединенија, детектирани во сите дванаесет анализирани примероци на вина од сортата Вранец. Всушност, беа пресметани површините на пиковите за сите соединенија од екстрахиралиот јонски хроматограм. Дополнително беше пресметана вкупната содржина на поединечните групи на соединенија, односно беа пресметани вкупни алкохоли, вкупни естри, вкупни масни киселини, вкупни алдехиди и вкупни кетони, како збир од релативните содржини на секоја компонента од соодветната хемиска група.

Табела 3. Ароматични соединенија идентификувани во вина од сортата Вранец класифицирани според хемиската група на која припаѓаат

Table 3. Aroma compounds identified in Vranec wine samples classified according to the chemical group

Бр.	Соединенија	$t_R$ /min	LRI
	<b>Алкохоли</b>		
1	1-пропанол	7,688	1018
3	изобутил алкохол	9,406	1053
5	1-бутанол	10,317	1082
6	3-метил-3-бутен-2-ол	10,862	1105

10	изоамил алкохол	12,288	1140
11	2-метил-1-бутанол	12,339	1150
14	1-пентанол	12,977	1173
17	2,3-бутандиол	13,303	1145
18	1,3-бутандиол	13,527	1200
21	4-Меил-1-пентанол	14,634	1243
23	3-метил-1-пентанол	14,854	1251
26	3-хексен-1-ол	15,14	1268
27	1-хексанол	15,4	1277
37	1-хептанол	17,679	1341
38	1-октен-3-ол	17,915	1342
45	2-етил хексанол	18,968	1443
48	1-октанол	19,805	1438
51	фенилетил алкохол	20,919	1555
	<b>Естри</b>		
2	етил ацетат	8,96	1033
7	етил естер на пропанска киселина	11,509	1108
8	пропил естер на оцетна киселина	11,582	1113
12	диметил естер на пропандиенска киселина	12,565	1157
13	2-метил-етил естер на пропанска киселина	12,751	1167
15	2-метилпропил естер на оцетна киселина	13,112	1176
19	етил естер на бутанска киселина	13,767	1233
24	2-метилетил естер на бутанска киселина	14,978	1253
25	3-метилетил естер на бутанска киселина,	15,043	1258
28	1-бутанол, 3-метил-ацетат	15,586	1279
29	1-бутанол, 2-метил- ацетат	15,647	1245
31	етил естер на пентанска киселина	16,123	1302
34	метил естер на хексанска киселина	16,686	1330



35	3-хидроксиетил естер на бутанска киселина	16,939	1335
41	етил естер на хексанова киселина	18,303	1403
42	етил естер на 3-хексанова киселина	18,431	1404
44	хексил естер на оцетна киселина	18,593	1429
46	етил естер на 2-хексанова киселина	19,262	1431
47	етил 2-хидроксикапроат	19,606	1436
52	етил хидроген сукцинат	21,482	1560
54	диетил естер на бутандионска киселина	21,891	1549
55	етил естер на октанска киселина	22,245	1609
57	етил естер на бензооцетна киселина	23,312	1657
59	2-фенилетил естер на оцетна киселина	23,554	1694
60	етил естер на нонанска киселина	24,037	1758
62	етил естер на деканска киселина	25,725	1827
63	<i>bis</i> -2-метилпропил естер на 1,2-бензендикарбоксилна киселина	32,834	1736
	<b>Масни киселини</b>		
16	бутанска киселина	13,193	1181
20	<i>iso</i> -валеријанска киселина	14,543	1236
22	2-метил-бутанска киселина	14,796	1246
36	хексанска киселина	17,628	1335
53	октанска киселина	21,59	1539
58	нонанска киселина	23,376	1667
61	<i>n</i> -деканска киселина	25,123	1794
	<b>Алдехиди и кетони</b>		
4	3-метил-бутанал	9,986	1064
9	3-хидрокси-2-бутанон	11,708	1138
32	<i>n</i> -хептанал	16,2	1317
40	2-октанон	18,183	1350
43	октанал	18,458	1410

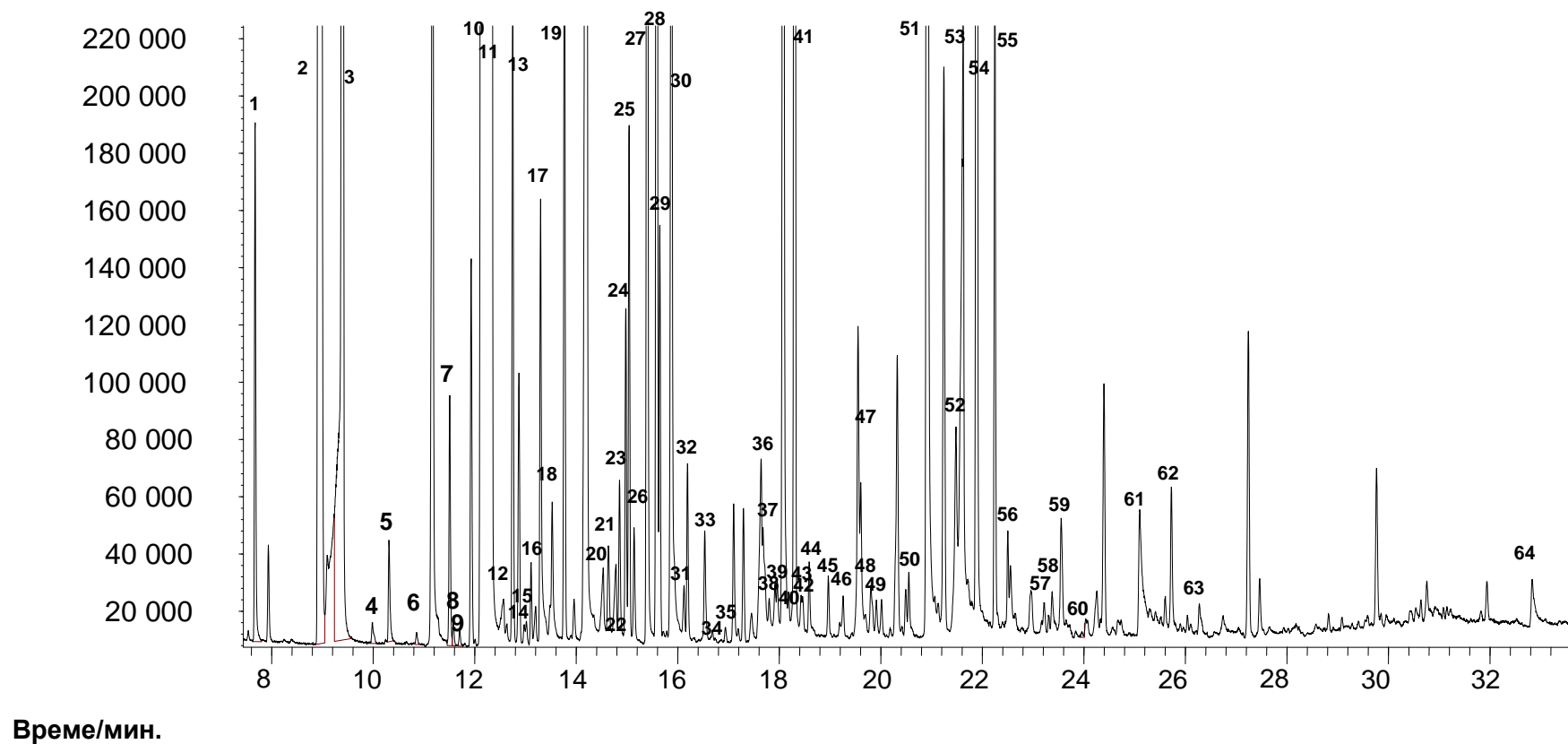
49	5-нонанон	19,913	1506
50	нонанал	20,551	1525
56	деканал	22,502	1654
	<b><i>Сулфурни соединенија</i></b>		
39	3-(метилтио)-1-пропанол	17,959	1347
	<b><i>Други соединенија</i></b>		
30	метокси-фенил оксим	15,873	1251
33	бутиролактон	16,531	1324

$t_R$  – ретенционо време

LRI - Линеарни ретенциони индекси (linear retention indices)

.

### Површина на пик



Слика 13. Вкупен јонски хроматограм на испарливи соединенија во вино вранец (примерок 7д-К). Бројките на пиковите одговараат на бројките во табела 3

Figura 13. Total ion chromatogram of the aroma compounds found in Vranec wine (sample 7d-C). Peak numbers refer to the compounds listed in Table 3.

### 5.2.1 Алкохоли

Алкохолите се соединенија коишто се создаваат за време на алкохолната ферментација како продукти од метаболизмот на квасецот. Во оваа магистерска работа се идентификувани 18 алкохоли во анализираните вина од сортата вранец (табела 3). Оваа фракција на испарливи компоненти главно е составена од пет соединенија кои се присутни во највисока концентрација, и тоа: изоамил алкохол, 2-метил-1-бутанол, фенилетил алкохол, изобутил алкохол и 1-хексанол, и е во согласност и со литературните податоци (Schreier, Drawert & Junder, 1976; Patel & Shibamoto, 2003; Jiang & Zhang, 2010). Овие компоненти вообичаено се создаваат од дејството на квасецот, и тоа главно од шеќерите или аминокиселините кои се присутни во гроздовата каша (Ivanova et al., 2012a). Покрај тоа, беше утврдено присуство на значително количество на 2,3-бутандиол, 1-пропанол и 1-хептанол во вината. На сл. 14 е прикажано релативното количество вкупни алкохоли во вината вранец произведени со различни енолошки практики.

Во однос на времето на мацерација, забележано беше дека настануваат промени во содржината на испарливите соединенија. Како што е прикажано на сл. 14, времето на мацерација влијае врз содржината на алкохолите, при што, највисока содржина е забележана за два лота вина (контролното вино и виното што содржи дабов чипс) мацерирани 7 дена, како и во виното со додаден ензим, произведено со мацерација од 14 дена. Потоа, во текот на мацерацијата и зголемување на времетраењето се забележува благо опаѓање на содржината на алкохолите кај сите вина (иако промената не е статистички значајна,  $p > 0,05$ ).

Од сите алкохоли, изоамил алкохол беше доминантен во оваа група. Слично како што се менува содржината на вкупите алкохоли, и содржината на изоамил алкохол се зголемува од четвртиот до седмиот ден на мацерација ( $p < 0,05$ ) во контролното вино (К) и во виното со дабов чипс (ДЧ), додека виното третирано со ензим (Е) содржи најмногу изоамил алкохол по четернаесет дена мацерација. Потоа, содржината на изоамил алкохол останува стабилна во сите вина и тоа може да се види во табела 4. Релативната содржина на изоамил алкохол и 1-хексанол благо се зголемува од четвртиот до четиринаесеттиот

ден на мацерација (но, разликите се статистички незначителни,  $p > 0,05$ ), проследено со благо намалување во виното мацерирано 30 дена. Забележани се слични промени во однос на фенилетил алкохол, најзначајниот фенилен алкохол. Така, неговата релативна содржина значително се зголемува на 14-тиот ден на мацерација во контролното вино, додека во вината со ензим и чипс, највисоката содржина е забележана во вината мацерирани седум дена. Потоа, не беше забележана значајна разлика во содржината на фенилетил алкохол ( $p > 0,05$ ) во другите вина. Всушност, екстракцијата на ароматичните компоненти од грозјето во ширата е главно процес на дифузија, но присуството на ензим и дабов чипс, како и подолгото време на мацерација може да придонесе за поефикасно извлекување на аромите во сокот, т.е. ширата. Така, во текот на мацерацијата во присуство на лушпите од грозјето, содржината на алкохолите се зголемува, што е во согласност со претходни истражувања (Rodríguez-Bencomo, Mendez-Siverio, Pérez-Trujillo & Cacho, 2008; Selli Cabaroglu, Canbas, Erten & Nurgel, 2003). Всушност, благото намалување на содржината на алкохоли во вината мацерирани подолго време (14 и 30 дена) е во согласност со литературата (Redeka, Lukić & Peršurić, 2012) и тоа може да се должи на фиксација на макромолекулите или на применетите третмани (додавање на ензим и дабов чипс). Всушност, додавањето на ензим и дабов чипс во виното може да влијае и да придонесе до подобра кларификација/разбистрување за вината, проследено со намалување на содржината на вишите алкохоли.

Според Romano et al. (2003), квасецот од видот *Saccharomyces cerevisiae* се карактеризира со високо производство на изоамил алкохол, како што е забележано во анализираните вина вронец, ферментирани со овој квасец, без разлика на применетите енолошки третмани. Во однос на применетите енолошки постапки, вклучувајќи додавање на ензим и дабов чипс за време на ферментацијата, вината со чипс (мацерирани 4, 7 и 30 дена) имаат највисока содржина на вкупни алкохоли. Добиените резултати се во согласност со литературните податоци (Pérez-Coello, Sanchez, García, Gonzalez-Vinas, Sanz & Cabezudo, 2000; Rodríguez-Bencomo Ortega-Heras & Perez-Magarin, 2010) каде што е утврдена повисока концентрација на алкохоли во вина ферментирани со дабов чипс, во однос на контролни вина. Фенилетил алкохол и изобутил алкохол беа присутни во највисока релативна содржина во вината

ферментирани со дабов чипс, отколку во контролните вина, без оглед на времето на мацерација (табела 4). Дополнително, не беше забележана значителна разлика во содржината на изоамил алкохол и 2-метил-1-бутанол ( $p > 0,05$ ) помеѓу вината (К, Е, ДЧ). Бидејќи вишите алкохоли се продукти на метаболизмот на квасецот, повисоки приноси во текот на ферментацијата може да се добијат кога гроздовата шира ферментира во присуство на чипс, бидејќи чипсот делува како носач на клетките на квасецот и има ефект сличен како тој на имобилизираните клетки (Rodríguez-Bencomo, Ortega-Heras & Perez-Magarin, 2010). Во однос на влијанието на ензимот, беше забележано дека релативната содржина на изоамил алкохол и вкупните алкохоли, како и количините на другите алкохоли во вината произведени со додаток на ензим, многу се слични меѓу себе и не се значително различни ( $p > 0,05$ ) од контролните вина, што укажува на фактот дека ензимот не влијае врз содржината на алкохолите.



Слика 14. Вкупни алкохоли

Figure 14. Total alcohols

Табела 4. Релативна содржина на најзастапените алкохоли и естри во вината  
Table 4. Relative amounts of the most abundant alcohols and esters in wines

Компоненти во вино	4д-К	4д-Е	4д-ДЧ	7д-К	7д-Е	7д-ДЧ	14д-К	14д-Е	14д-ДЧ	30д-К	30д-Е	30д-ДЧ
<b>Алкохоли</b>												
изоамил алкохол	312552752± 1,81a	278765131 ± 0,34е,ф	308397741 ± 5,58б,ц,д	339085903 ± 2,47a	330110824 ± 1,48е	349063458 ± 1,67б	325085165 ± 1,93	335614975 ± 1,82ф,г	326459816 ± 0,89ц	323605123 ± ,24	318149254 ± 1,43г	333890854 ± 1,29д
2-метил-1-бутнол	50811446 ± 4,35ц,д,е	49397027 ± 1,73ф,г,х	49572388 ± 2,68	54759469 ± 3,18a,ц	54023683 ± 0,58б,ф	58544884 ± 0,18a,б	56203745 ± 1,21д	55953058 ± 0,12г	55497746 ± 1,59	56506992 ± 1,32е	54818473 ± 1,24х	57407018 ± 0,35
фенилетил алкохол	34276411 ± 7,07д	29788002 ± 2,94a,б,ц	35338670 ± 7,95	33382106 ± 0,59	34839551\ ± 6,52a	37739595 ± 4,18	36166810 ± 2,62д	34823873 ± 3,50б	37988743 ± 7,77	34470241 ± 0,18	33671406 ± 1,73ц	36913805 ± 4,66
изобутил алкохол	27163569 ± 6,32	27418570 ± 7,07	28749471 ± 7,26	23886181 ± 5,03a	26803890 ± 6,8	31418699 ± 4,2a	27785922 ± 6,12б	29172050 ± 8,72	30551991 ± 0,05б	27276521 ± 4,76ц	27821294 ± 0,66	31255800 ± 5,59ц
1-хексаноол	17502631 ± 0,17	13259968 ± 1,48	14694177 ± 8,02	18199006 ± 0,4	15030420 ± 5,95	16348709 ± 2,41	18591971 ± 1,19	16357051 ± 2,92	16416245 ± 0,83	18363226 ± 1,56	16010077 ± 0,77	16561388 ± 0,51
<b>Естри</b>												
етил ацетат	130412321 ± 1,48a	121020641 ± 0,2	119814512 ± 6,44a	115948753 ± 2,6	109332415 ± 2,29	106162582 ± 6,67	117149788 ± 3,65	128541786 ± 3,41a	110860533 ± 1,27a	124593192 ± 0,33	124613333 ± 0,3	119768724 ± 4,9
диетил естер на битандионска киселина	27585642 ± 4,46a,б,д,е	24547052 ± 5,19	22566787 ± 8,78a	24930461 ± 1,0б	25768820 ± 2,12	26095052 ± 7,19	24582033 ± 0,85ц,д	27307459 ± 1,49	24629711 ± 6,52	21994073 ± 3,0е	24034276 ± 1,25	21410779 ± 6,16
1-бутанол, 3- метил-ацетат	14758668 ± 4,01a	11520948 ± 2,66a,б	18852067 ± 6,16a	14565532 ± 4,45	14376943 ± 1,7б	14022865 ± 0,5	13967656 ± 1,26	12991303 ± 5,56	12985884 ± 1,5	13071049 ± 0,57	12114624 ± 1,83	12591200 ± 0,57
етил естер на пропанска киселина	1948230 ± 5,95a	1664527 ± 0,77	1797322 ± 5,76	1751009 ± 0,01a	1524309 ± 6,71	1792733 ± 3,89	1709419 ± 2,01a	1833038 ± 2,46	1623086 ± 2,93	1685899 ± 3,73a	1672656 ± 2,68	1732832 ± 4,38
етил естер на пропанска киселина	1948230 ± 0,77a,б,ц,д,е	1664526 ± 5,75a	1797322 ± 5,94б	1751009 ± 0,01ц	1524309 ± 6,71	1792733 ± 3,89	1709419 ± 2,01д	1833038 ± 2,96	1623086 ± 2,45	1685899 ± 2,68е	1672656 ± 3,73	1732832 ± 4,38
етил естер на бутанска киселина	4583750 ± 0,31a,б,ц	3902506 ± 6,02a	6228288 ± 0,57a,б	6248936 ± 0,21ц	5284343 ± 6,36	6141737 ± 0,47	4734230 ± 2,24	4754235 ± 3,35	4548301 ± 4,04	4864231 ± 2,42	4699428 ± 4,56	4955087 ± 2,22
етил естер на пентанска киселина	383970 ± 2,09a,б,ц,д	419277 ± 6,74a	481744 ± 5,87a	549516 ± 2,32б	542377 ± 2,99	593216 ± 2,01	511389 ± 4,33	534767 ± 6,53	617043 ± 3,51	548665 ± 1,02д	549433 ± 1,21	729116 ± 6,07
етил естер на хексанова киселина	18018540 ± 3,96a	15207526 ± 4,38,a	21663263 ± 2,38a	18906523 ± 4,34	19372797 ± 2,12	16211089 ± 0,39	19471586 ± 1,86	19877121 ± 1,41	16017352 ± 3,63	19331478 ± 1,43	19187651 ± 2,93	16541061 ± 0,34

Резултатите се прикажани како средна вредност од 4 повторувања  $\pm RSD$  (релативна стандардна девијација). Ознаките на вината одговараат на оние од табела 3. Вредностите означени со исти индекси во истиот ред се значително различни при  $p < 0,05$ , анализирани со тест Student-Newman-Keul's. Вредностите без горен индекс не се значително различни ( $p > 0,05$ ) во истиот ред.

### 5.2.2. Естри

Естрите се уште една група на испарливи соединенија кои имаат големо влијание врз ароматскиот профил на виното. Во ова истражување беше утврдено дека произведените вина од сортата Вранец се богати со естри бидејќи беа идентификувани вкупно 29 поединечни естри. Меѓу нив, етил ацетат е доминантно соединие од оваа група, по што следува диетил естер на килибарна киселина, 1-бутанол-3-метил ацетат и етил естер на пропанска киселина. Исто така, значајни количини и на други етил естри беа детектирани во вината, како што се: етил естер на бутанска киселина, етил естер на октанска киселина, 2-метил-етил естер на пропанска киселина, 3-метилетил естер на бутанска киселина, етил хидрогенсукцинат и 1-бутанол-2-метил-ацетат.

Проучувајќи го влијанието на времето на мацерација беше забележано дека при контакт со лушпата од грозјето доаѓа до зголемување на релативната содржина на естри во контролното вино и во виното третирано со ензим, при тоа, зголемувањето е забележано од четвртиот до седмиот ден од мацерација. Потоа, содржината на естри остана стабилна ( $p > 0,05$ ). Кај вината третирани со дабов чипс е забележана највисока содржина на естри во виното мацерирано 4 дена (сл. 15). Понатамошното зголемување на времето на мацерација во ова вино доведува до намалување на содржина на естрите.

Во групата на естри, најзначаен естер, присутен во највисока концентрација е етил ацетат. Беше забележано дека времето на мацерација не влијае значително врз неговата релативна содржина, односно дека таа е слична во вината мацерирани 4, 7, 14 и 30 дена. Исто така, не беа забележани значителни разлики на овој естер и во вината третирани со ензим и дабов чипс. Диетил естер на килибарна киселина достигна највисока содржина во контролното вино мацерирано 4 дена, проследено со намалување на количините во текот на мацерацијата. Во вината третирани со ензим и дабов чипс, овој естер значително се зголеми, достигнувајќи највисока содржина во вината мацерирани 7 и 14 дена, соодветно (табела 4). Подолгото време на мацерација, исто така, предизвика зголемување на релативната содржина на етил естерот на хексанска киселина во контролното вино и во ензимски третираното вино. Во виното со дабов чипс, највисоката содржина на овој естер беше забележана во виното мацерирано четири дена, проследено со



значително намалување на содржината сè до седмиот ден на мацерација ( $p < 0,05$ ), а потоа останува стабилна во вината мацерирани четиринаесет и триесет дена. Според податоците од литературата, времето на мацерација не влијае директно врз содржината на естрите во виното (Rapp, Günter, & Ullemeyer, 1985). Подолгото траење на мацерацијата може дури да предизвика намалување на ацетатите од вишите алкохоли и етил естри на масните киселини, како што тоа е забележано и кај некои естри во ова истражување, најверојатно како резултат на неензиматска хидролиза.

Во врска со влијанието на ензимот и дабовиот чипс беше забележано дека вината што содржат чипс во текот на ферментацијата и се мацерирани 4 дена, имаат највисока содржина на естри. Така, утврдено е дека следните естри: етил естер на пропанска киселина, етил естер на бутанска киселина, етил естер на пентанска киселина и етил естер на хексанска киселина се присутни во повисоки релативни содржини во вината ферментирани со дабови чипсови, додека влијанието на ензимот на овие естри е незначително (табела 4).

Естерите се многу важни компоненти на аромата во виното. Тие придонесуваат за генералниот квалитет на виното и обезбедуваат нежни „овошни“ и „цветни“ мириси, но и влијаат врз сензорните својства и ароматичната долготрајност на вината. Нивната форма и содржина во виното главно зависат од бројот на алкохоли и киселини. Бидејќи виното содржи голем број различни алкохоли и киселини кои учествуваат во реакции на естерификација, се очекува бројот на формирани естри во виното да биде висок, како што беше забележано и во ова истражување. Освен тоа, нашите резултати покажуваат дека времето на мацерација и енолошките практики до одреден степен влијаат врз формирањето и варијацијата на различните естри коишто придонесуваат за аромата во виното.



**Слика 15. Вкупни естри**

**Figure 15. Total esters**

### **5.2.3. Масни киселини**

Во групата на масни киселини беа детектирани 7 соединенија во вината од сортата Вранец, вклучувајќи бутанска киселина, *iso*-валеријанска киселина, 3-метил-бутанска киселина, 2-метил-бутанска киселина, хексанска, октанска, нонанска и деканска киселина. Меѓу нив, доминантна е октанската киселина, проследена со хексанска киселина. Од добиените резултати, беше забележано дека релативните содржини на масните киселини (сл.16) се зголемуваат од четвртиот ден до седмиот ден на мацерација во контролното вино и во виното третирано со ензими. Во виното со дабов чипс, највисока содржина на масни киселини е забележана во виното мацерирано 4 дена, проследено со нејзино намалување со зголемување на времето на мацерација ( $p > 0,05$ ).

Формирањето и присуството на масни киселини во виното зависи од составот на грозјето и условите за ферментација (Schreier & Jennings, 1979, García-Carpintero). Така, овие соединенија може да се формираат во текот на анаболни патишта во квасец или би можеле да произлезат преку  $\beta$ -оксидација на повисоките масни киселини. Масните киселини, исто така може да формираат естри, што би било причина за намалување на нивната содржина во текот на мацерација, особено евидентно за вината што содржат дабов чипс.

Освен тоа, во текот на мацерацијата и алкохолната ферментација, масните киселини можат да ги користи квасецот како извор на јаглерод, предизвикувајќи намалување на нивните содржини. Обично, присуството на масни киселини во виното е поврзано со непријатни мириси, иако овие соединенија немаат директен негативен ефект врз мирисот на вината бидејќи тие се присутни во ниски концентрации.

Во однос на влијанието на дабовиот чипс на содржината на масни киселини беше забележано дека вината ферментирани 4 и 30 дена во присуство на чипс имаат највисоки содржини на масни киселини, вклучувајќи ги доминантните, октанската и хексанската киселина. Кај вината мацерирани 7 и 14 дена не беа забележани значителни разлики на овие две киселини. Слични резултати биле добиени и во истражувањето на Rodriguez-Bencomo, Ortega-Heras & Pérez-Magariño (2010) кои исто така утврдиле повисоки концентрации на хексанска и октанска киселина во црвени вина ферментирани со дабов чипс. Во нашето истражување не е забележано значајно влијание на ензимот врз содржината на масните киселини, што е во согласност со литературата (Rodríguez-Bencomo, Mendez-Siverio, Pérez-Trujillo, 2010).



Слика 16. Вкупни масни киселини

Figure 16. Total fatty acids

### 5.2.3. Карбонилни соединенија

Во групата на карбонилни соединенија беше утврдено дека *n*-хептанал и деканал се присутни во највисока содржина во вината мацерирани 4 дена. Потоа, беше забележано дека нивната содржина се намалува со зголемување на времето на мацерација (сл. 17). Овие соединенија се формираат во реакција на оксидација на алкохоли до алдехиди или кетони. Освен тоа, карбонилните соединенија може да учествуваат во понатамошни реакции на оксидација, при што се формираат карбоксилни киселини. Сето тоа доведува до намалување на содржината на карбонилните соединенија во текот на ферментацијата, како што и беше забележано во ова истражување. Додавањето на дабов чипс во виното предизвика формирање на карбонилните соединенија во повисока содржина, додека присуството на ензим во виното не доведе до значителен ефект врз содржината на овие соединенија. Единствено, кај виното мацерирано 4 дена во присуство на ензим беа забележани помали количини на карбонилни соединенија во однос на контролното вино.



Слика 17. Вкупни карбонилни соединенија

Figure 17. Total carbonyl compounds

#### **5.2.4. Други соединенија**

Во групата на други испарливи соединенија беа детектирани едно сулфурно соединение и еден лактон, 3-(метилтио)-1-пропанол и бутиролактон, соодветно. Беше забележано дека релативната содржина на овие соединенија се зголемува во текот на мацерација. При тоа беше утврдено дека виното третирано со ензим има најмала содржина на овие соединенија во однос на контролното вино и виното со дабов чипс.

Според Moreira et al. (2002), формирањето на сулфурни соединенија во виното е поврзано со метаболизмот на квасецот и составот на азот во ширата. 3-(метилтио)-1-пропанол е едно од помалку испарливите сулфурни соединенија присутни во вината, кое може да придонесе до појава на мирис на карфиол, доколку е присутно во концентрација повисока од границата на осетливост. Другото детектирано соединение, бутиролактон, многу често се сретнува во групата на испарливи соединенија на виното. Бутиролактон нема влијание врз сензорните својства на виното бидејќи е присутен во релативно ниски концентрации кои не влијаат врз аромата на виното. Тој се формира од 4-хидроксипутанска киселина при внатрешна естерификација.

#### **5.3. Карактеристична векторска анализа (КВА)**

За да се добијат корисни информации од резултатите за ароматичните соединенија во вината Вранец произведени со различни винификации беше применета статистичка обработка на податоците со карактеристична векторска анализа (КВА). Оваа анализа беше применета на податоците за релативната содржина на секое идентификувано испарливо соединение, пресметана од површината на пиковите за соодветните компоненти од екстрахираниот јонски хроматограм. Карактеристичната векторска анализа беше изведена со цел да се утврди ефектот на секој поединечен параметар (времето на мацерација од 4, 7, 14 и 30 дена, додавање на ензим и дабов чипс во текот на ферментација) врз ароматскиот профил на анализираниите вина и да се идентификуваат испарливите компоненти според кои се разликуваат и групираат вината.

Првите две главни компоненти KB1 и KB2, учествуваат со 52,19 % од вкупната варијанца, при што најголемо е влијанието на првиот карактеристичен вектор KB1 кој носи 33,99 % од веројатноста, а потоа на вториот карактеристичен вектор KB2 со 18,29 % од веројатноста. Од корелацискиот дијаграм на сл. 18 се гледа јасна поделба на вината според времето на мацерација. Така, вината се главно поделени и разделени во три групи: вината мацерирани 4 дена формираа една група (тие се јасно одделени од другите вина и се наоѓаа во позитивниот дел од KB1), вината мацерирани 7 дена ја формираа втората група, којашто се наоѓа околу оската и покрај KB2, додека третата група е составена од вина мацерирани 14 и 30 дена, и оваа група е лоцирана во негативниот дел од KB1. Според ова, KB1 најмногу се поврзува со времето на мацерација.

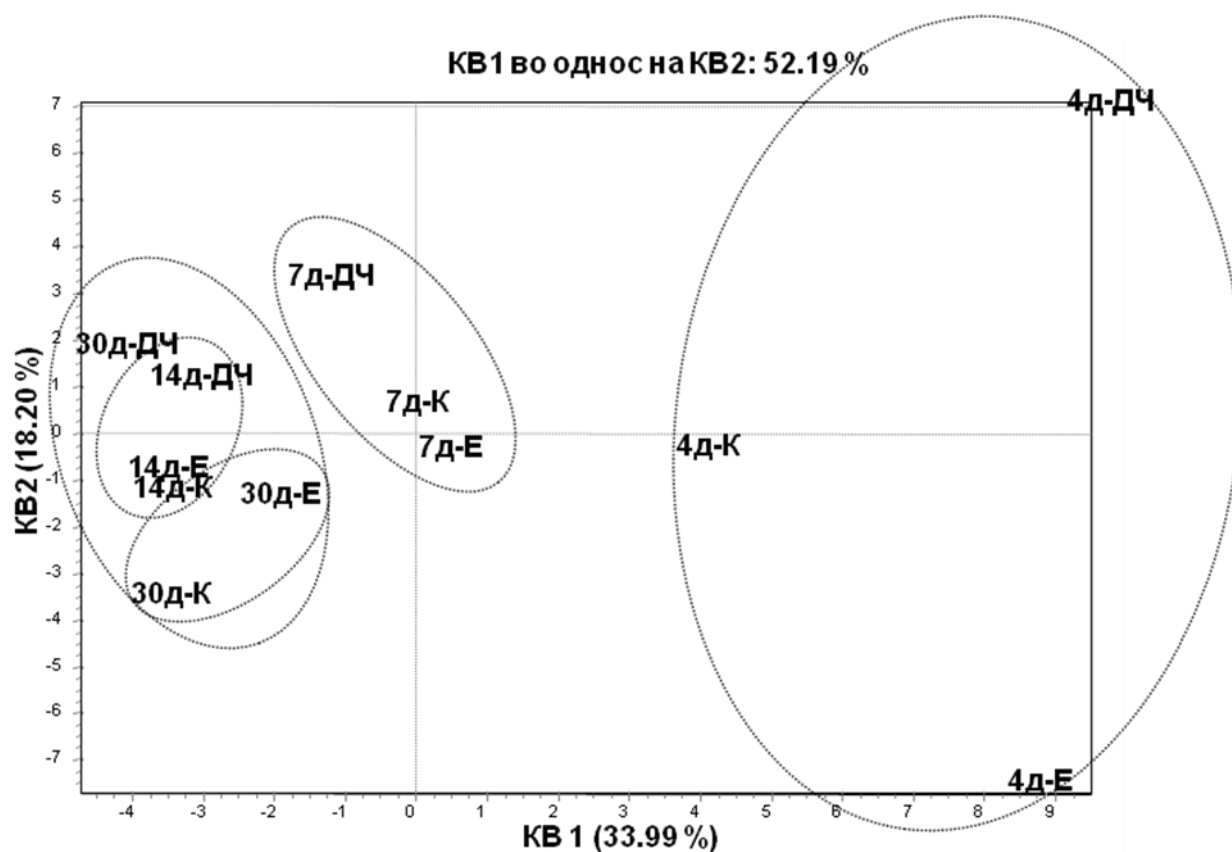
Со КВА беа утврдени и прикажани главните компоненти што се одговорни за разликите во испарливиот состав на вината произведени со различни енолошки постапки (слика 19). Така, одговорните компоненти за групирање на вината се:

- алкохоли: изобутил алкохол (3); 1-пентанол (14); 1,3-бутандиол (18); 1-хексанол (27); 1-хептанол (37) и
- естри: 2-метил-етил естер на пропанска киселина (13); Етил естер на бутанска киселина (19); 2-метилетил естер на бутанска киселина (24); 3-метилетил естер на бутанска киселина (25) и 1-бутанол-3-метил ацетат (28).

Овие компоненти се негативно поврзани со KB1 и се специфични за вината добиени со мацерација од 14 и 30 дена. Понатаму, параметрите што ги дискриминираат вината, добиени со мацерација од 7 дена, се: пропил естер на оцетна киселина (8); хексил естер на оцетна киселина (44) и 2-метил-бутанска киселина (22).

Во однос на KB2 беше забележано раздвојување на вината според применетиот третман со ензим и дабов чипс. Така, вината што содржат дабов чипс се лоцирани во позитивниот дел од KB2, а контролните вина и ензимски третираните вина се наоѓаат во негативниот дел од KB2 (со исклучок на виното 7д-К), како што е прикажано на слика 18. Ова значи дека KB2 се поврзува со третманот на вината со дабов чипс. Главните компоненти одговорни за разликите на вината во однос на различните енолошки постапки се: изобутил

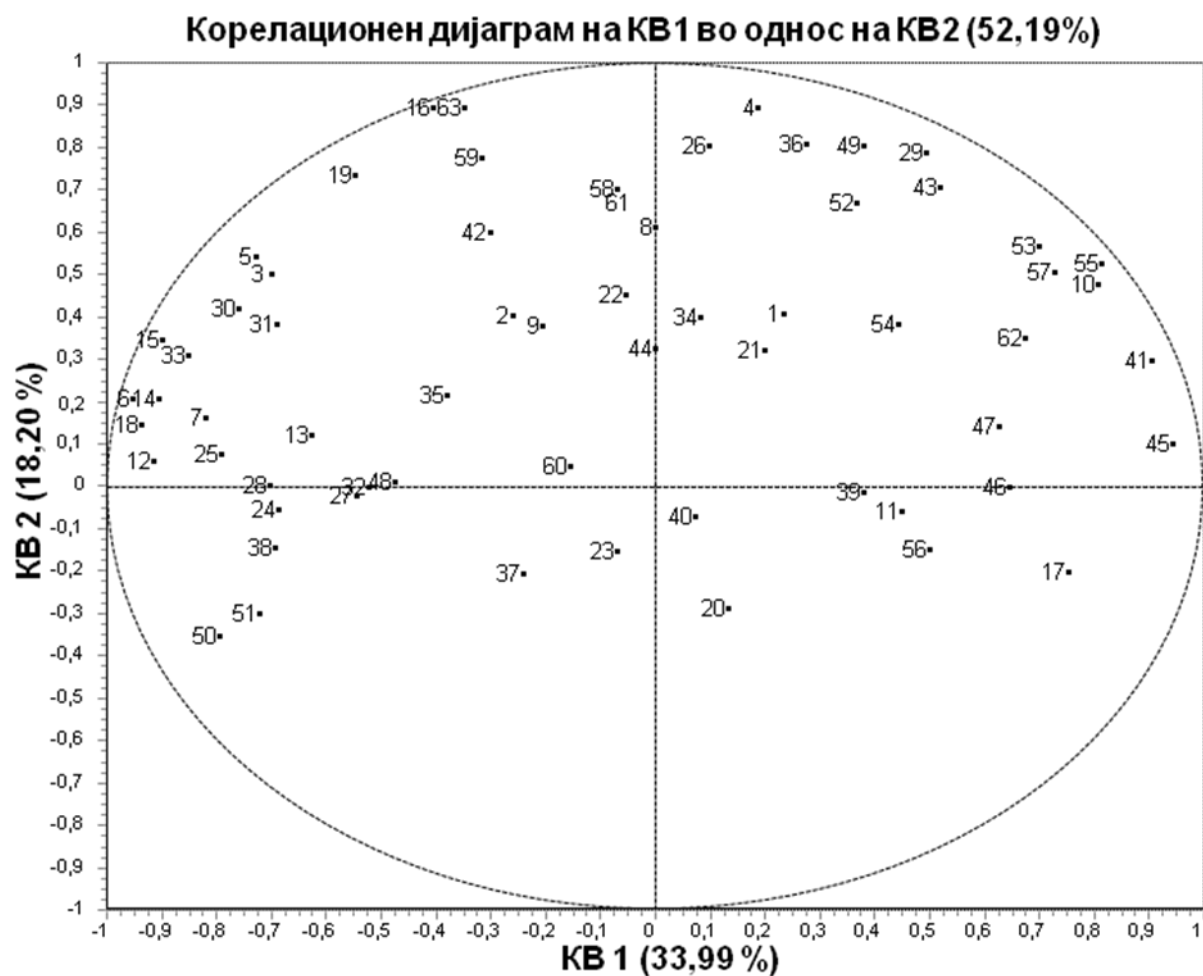
алкохол (3), фенилетил алкохол (51); 1-пропанол (1); 1-бутанол (5); бутиролактон (33); етил естер на пропанска киселина (7); етил естер на бутанска киселина (19), етил естер на пентанска киселина (31) и етил естер на хексанска киселина (41), специфични за вината со додаток на дабов чипс.



Слика 18

#### ***А) Корелациски дијаграм***

Бројките во корелациските дијаграми под А и Б на слика 18 одговараат со соединенијата кои се прикажани во табела 4.



**Б) Корелациски дијаграм**

Слика 18. Корелациски дијаграми (А и Б) на KB1 во однос на KB2 според GC-MS податоците за испарливи соединенија во вината Вранец

Figura 18. Correlation diagrams (A and B) of PC1 with respect to PC2 according to the GC-MS data for volatile compounds in Vranec wines



## 6. ЗАКЛУЧОК

Од испитувањата на вина од сортата Вранец, произведени при контролирани услови на винификација, вклучувајќи ги времето на мацерација и додатокот на ензим и дабов чипс, добиен е ароматски профил на вината составен од вкупно 63 индивидуални ароматични соединенија. Анализата е извршена со примена на техниката HS-SPME-GC-MS.

Вината од сортата вранец имаат комплексен ароматски профил, богат со различни групи на ароматични соединенија: естри, алкохоли, масни киселини, алдехиди и кетони. Беше заклучено дека должината на мацерацијата, како и додавањето на дабов чипс во текот на ферментацијата, односно контактот на виното со дрвото, влијаеле врз профилот на аромата на оваа сорта. Резултатите покажаа дека времето на мацерација влијае врз содржината на ароматските соединенија, што доведува до зголемување на релативните содржини од четвртиот до седмиот ден од мацерацијата.

Присуството на дабов чипс за време на ферментацијата го подобри формирањето на ароматските испарливи соединенија, како што се фенилетил алкохол, изобутил алкохол, етил естер на пропанска киселина, етил естер на бутанска киселина, етил естер на пентанска киселина и етил естер на хексанска киселина.

Не е забележан значителен ефект на ензимот врз ароматскиот профил на вината Вранец. Но, затоа примената на ензим може да најде примена во технологијата на црвени вина богати со полифеноли, вклучувајќи го и виното Вранец.

## 7. КОРИСТЕНА ЛИТЕРАТУРА

- Божиновиќ, З. (1996). Ампелографија, Академик ДОО Скопје.
- Вајн, Р. П. (2011). Почитување на виното, АРС Ламина ДОО Скопје.
- Донева-Шапчевска, Д. (2005). Влијание на слободните и гликозидно врзаните монотерпени врз аромата на грозјето и вината, Докторска дисертација, Технолошко-металуршки факултет, Универзитет „Св. Кирил и Методиј“, Скопје.
- Иванова, В. (2009). Разработка на методи на идентификација и квантификација на фенолни супстанции во вино и грозје со примена на спектрофотометрија, течна хроматографија и масена спектрометрија, Докторска дисертација, Природно-математички факултет, Универзитет „Св. Кирил и Методиј“, Скопје.
- Иванова-Петропулос, В. (2013а). Сензорна и аналитичка еволуација на вино, Универзитет „Гоце Делчев“ - Штип.
- Иванова-Петропулос, В. (2013б). Практикум по сензорна и аналитичка евалуација на вино, Универзитет „Гоце Делчев“ – Штип.
- Маргалит, Ј. (2011). Концепти во хемијата на виното, АРС Ламина ДОО Скопје.
- Настев, Д. (1984). Технологија на виното, Универзитет „Св. Кирил и Методиј“, Скопје, 314-321.
- Хорнси, И. (2007). Хемија и биологија на производството на вино, АРС Ламина ДОО Скопје, стр.1-3, 92-97.
- Џексон, Р. Џ. (2013). Наука за виното основи и примена, АРС Ламина ДОО Скопје.
- Aehle, W. (2007). *Enzymes in Industry Production and Applications Third, Completely Revised Edition*, 2007 WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim.
- Armada, L., Fernández, E. & Falqué, E. (2010). Influence of several enzymatic treatments on aromatic composition of white wines. *LWT – Food Science and Technology*, 43, 517 – 1525.
- Barros, E. P., Moreira, N., Pereira, G. E., Leite, S. G. F., Rezende, C. M. & de Pinho, P.G. (2012). Development and validation of automatic HS-SPME with a gas chromatography-ion trap/mass spectrometry method for analysis of volatiles in wines, *Talanta*, 101, 177–186.

- Bautista-Ortín, A. B., Martínez-Cutillas, A., Ros-García, J.M., López-Roca, J.M. & Gómez-Plaza, E. (2005). Improving colour extraction and stability in red wines: the use of maceration enzymes and enological tannins. *International Journal of Food Science and Technology*, 40, 867 – 878.
- Bozalongo, R., Carrillo, J. D., Fernández Torroba, M .A., & Tena, M. T. (2007). Analysis of French and American Oak Chips with Different Toasting Degrees by Headspace Solid-Phase Microextraction-Gas Chromatography-Mass Spectrometry. *Journal of Chromatography*, 1173, 10 – 17.
- Bureau, S., Razungles, A., & Baumes, R. (2000). The aroma of muscat of Frogtignan grapes: Effect of the light environment of vine or bunch on volatiles and glycoconjugates. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80, 2012 – 2020.
- Burns, J., Gardner, P. T., O'Neil, J., Crawford S., Morecroft, I., Mc Phail, D. B., Lister C., Matthews, D., MacLean, M. R., Lean M. E. J. & Crozier A. (2000). Relationship among antioxidant activity, vasodilation capacity, and phenolic content of red wines, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 220-230.
- Camarra, C., Collombet, F., Paireault, J-P. & Verlag, K. M. (1995). *Weine aus aller Welt*, ISBN 3-86070-393-5.
- Castro-Vázquez, I., Pérez-Coello, M.S. & Cabezudo, M. D. (2002). Effects of enzyme treatment and skin extraction on varietal volatiles in Spanish wines made from Chardonnay, Muscat, Airén, and Macabeo grapes. *Analytica Chimica Acta*, 458, 39 – 44.
- Cerdán, G.T., Goñi, T. D., & Azpilicueta, A. C. (2004). Accumulation of volatile compounds during ageing of two red wines with different composition. *Journal of Food Engineering*, 65, 349 – 356.
- Dimovska, V., Ivanova, V., Ilieva, F., Sofijanovska, E. & Kletnikoski, P. (2011). The state of table grape varieties in R. Macedonia, *Science & Technologies*, 1, 30-34.
- Espejo, F. & Armada, S. (2010). Effect of Enzyme Addition in the Making of Pedro Ximenez Sweet Wines Using Dynamic Pre-fermentative Maceration, Quality Department, Navisa Industrial Vinícola Española S.A. Ctra. de Montalbán s/n, 14550 Montilla, Córdoba, Spain.

- Farkas, P., Le Quere J.L., Maarse, H. & Kovac, M. (1994). The standard GC retention index library of flavour compounds. *Developments in Food Science*, 35, 145-149.
- García-Carpintero, E.G., Gómez Gallego, M.A., Sánchez-Palomo, E. & González Viñas, M.A. (2012). Impact of alternative technique to ageing using oak chips in alcoholic or in malolactic fermentation on volatile and sensory composition of red wines. *Food Chemistry*, 134, 851-863.
- Grivetti, L. E. (1996). Wine: The Food with Two Faces, in P.E.McGovern, S.J. Fleming and S.H. Katz, (eds), *The Origins and Ancient History of Wine*, Gordon & Breach, Amsterdam.
- Haßelbeck, G. & Henke, W. (2010). Erbslöh, Geisenheim, Germany – Wine Compendium Enzymes.
- Hernandez Orte, P., Guitart, A., Ferreira, V., Gracia, J. & Cacho, J. (1998). Effect of maceration time and the addition of enzymes on the amino acid composition of musts and wines and its influence on wine aroma. *Food Science and Technology International*, 4, 407-418.
- Ivanova, V., Stefova, M. & Chinnici, F. (2010). Determination of polyphenol contents in Macedonian grapes and wines assessed by standardized spectrophotometric methods. *Journal of the Serbian Chemical Society*, 75, 45-59.
- Ivanova, V., Stefova, M., Vojnoski, B., Stafilov, T., Bíró, I., Bufa, A., Felinger, A. & Kilár, F. (2013). Volatile composition of Macedonian and Hungarian wines assessed by GC-MS. *Food and Bioprocess Technology*, 6, 1609-1617.
- Ivanova, V., Stefova M., Stafilov, T., Vojnoski B., Bíró, I., Bufa, A., Kilár, F. (2012a). Validation of a Method for Analytis of Aroma Compounds in Red Wine using Liquid-Liquid Extractionand GC-MS. *Food Analytical Methods*, 5, 1427-1434.
- Ivanova, V., Vojnoski, B. & Stefova, M. (2012b). Effect of winemaking treatment and wine aging on phenolic content in Vranec wines. *Journal of Food Science and Technology*, 49, 161-172.
- Ivanova Petropulos, V., Bogeve, E., Stafilov, T., Stefova, M., Siegmund, B., Pabi, N. & Lankmayr, E. (2014). Study of the influence of maceration time and oenological practices on the aroma profile of Vranec wines. *Food Chemistry* 165, 506-514.
- Ivanova-Petropulos, V., Durakova, S., Ricci, A., Parpinello, G. P. & Versari, A. (2016). Extracion and evaluation of natural occurring bioactive compounds

- and change in antioxidant activity during red winemaking. *Journal of Food Science and Technology*, 53 (6). 2634-2643.
- Ivanova-Petropulos, V., Ricci, A., Nedelkovski, D., Dimovska, V., Parpinnelo, G.P. & Versari, A. (2015). Targeted analysis of bioactive phenolic compounds and antioxidant activity of Macedonian red wines. *Food Chemistry*, 171:414–420.
- Jackson, D. I. & Lombard, P. B. (1993). Environmental and management practices affecting grape composition and wine quality – a review. *American Journal of Enology and Viticulture*, 44, 409 – 430.
- Jacques, P. (2003). Barrel making (an art in the service of wine), Hermé, Paris, Journal des scies et techniques de la tonnellerie (1996) Volume 2, Vigne et Vin publication Internationales.
- Jiang, B. & Zhang, Z. (2010). Volatile Compounds of Young Wines from Cabernet Sauvignon, Cabernet Gernischet and Chardonnay Varieties Grown in the Loess Plateau Region of China. *Molecules*, 15, 9184-9196.
- Jourdes, M., Michel, J., Saucier, C., Quideau, S. & Teissedre, P.-L. (2011). Identification, amounts, and kinetics of extraction of C-glucosidic ellagitannins during wine aging in oak barrels or in stainless steel tanks with oak chips. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 401, 1531–1539.
- Košmerl, T., Bertalaníč, L., Maraš, V., Kodžulović, V., Šućur, S. & Abramović, H. (2013). Impact of yield on total polyphenols, anthocyanins, reducing sugars and antioxidant potential in white and red wines produced from Montenegrin autochthonous grape varieties. *Food Science and Technology*, 1, 7–15.
- Lee, S. H., Seo, M. J., Riu, M., Cotta, J. P., Block, D. E., Dokoozlian, N. K. & Ebeler, S. E. (2007). Vine microclimate and norisoprenoid concentration in Cabernet Sauvignon grapes and wines. *American Journal of Enology and Viticulture*, 58, 291 – 301.
- Macedo, S., Fernandes, S., Lopes, J. A., de Sousa, H. C., Pereira, P. J., Carmelo, P. J., Menduiña, C., Simões, P. C. & da Ponte, M. M. (2008). Recovery of wine-must aroma compounds by supercritical CO<sub>2</sub>. *Food and Bioprocess Technology*, 1, 74 – 81.
- Mar Vilanova, Zlatina Genisheva, Antón Masa, José Maria Oliveira (2010). Correlation between volatile composition and sensory properties in Spanish Albariño wines. *Microchemical Journal* 95 p.p. 240–246.

- Mendes, B., Gonçalves, J. & Câmara, J.C. (2012). Effectiveness of high-throughput miniaturized sorbent and solid phase microextraction techniques combined with gas chromatography–mass spectrometry analysis for a rapid screening of volatile and semi-volatile composition of wines - A comparative study. *Talanta*, 88, 79-94.
- Moreira, N., Mendes F., Pereira O., Guedes de Pinho P., Hogg T. & Vasconcelos I., (2002). Volatile sulphuric compounds in wines related to yeast metabolism and nitrogen composition of grape musts. *Analytica Chimica Acta*, 458, 157 – 167.
- Patel, S. & Shibamoto, T. (2003). Effect of 20 different yeast strains on the production of volatile components in Symphony wine. *Journal of Food Composition and Analysis*, 16, 469–476.
- Pérez-Coello, M.S., Sanchez, M.A., García, E., Gonzalez-Vinas, M.A., Sanz, J. & Cabezudo, M.D. (2000). Fermentation of White Wines in the Presence of Wood Chips of American and French Oak. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 885–889.
- Perestrelo, R., Caldeira, M., Rodrigues, F. & Câmara J. (2008). Volatile flavour constituent patterns of Terras Madeirenses red wines extracted by dynamic headspace solid-phase microextraction. *Journal of Separation Science*, 31, 1841 – 1850.
- Puškaš, V.S. (2010). Uticaj tehnoloških faktora u proizvodnji crvenih vina na sadržaj i stabilnost katehina i njihovih oligomera. Tehnološki fakultet Novi Sad, doktorska disertacija, 18-64.
- Rapp, A., Günter, M. & Ullemeyer, H. (1985). Über Veränderungen der Aromastoffe während der Flaschenlagerung von Weißweinen der Rebsorte Riesling. *Zeitschrift für Lebensmittel Untersuchung und Forschung*, 180, 109 – 116.
- Rajković, M.B., Sredović, I.D. (2009). The determination of titratable acidity and total tannins in red wine. *Journal of Agricultural Sciences*, 54, 223–346.
- Rayne, S., Sheppard, S., Di Bello, T. & Eggers, N. J. (2011). Chromatic Characteristics and Optically Derived Compositional Descriptors of Micro-oxygenated Wines from *Vitis vinifera* cv. Merlot and Cabernet Sauvignon. *Food and Bioprocess Technology*, 4, 254 – 265.
- Revilla, I. & González-San José, M.L. (2003). Compositional changes during the storage of red wines treated with pectolytic enzymes: low molecular-weight phenols and flavan-3-ol derivative levels. *Food Chemistry*, 80, 205 – 214.

- Rodriguez –Bencomo, J. J., Mendez-Siverio, J. J., Pérez-Trujillo, J. P., & Cacho, J. (2008). Effect of skin contact on bound aroma and free volatiles of Listan blanco wine. *Food Chemistry*, 110, 214 – 225.
- Rodríguez-Bencomo, J. J., Ortega-Heras, M. & Perez-Magarin, S. (2010). Effect of alternative techniques to ageing on lees and use of non-toasted oak chips in alcoholic fermentation on the aromatic composition of red wine. *European Food Research and Technology*, 230, 485–496.
- Romano, P., Fiore, C., Paraggio, M., Caruso, M. & Capece, A. (2003). Function of yeast species and strains in wine flavour. *International Journal of Food Microbiology*, 86, 169 – 180.
- Schreier, P., Drawert, F. & Junder, A. (1976). Identification of volatile constituents from grapes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 24, 331–336.
- Schreier, P. & Jennings, W. G. (1979). Flavor composition of wines: A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 12, 59 – 111.
- Selli, S., Cabaroglu, T., Canbas, A., Erten, H. & Nurgel, C. (2003). Effect of skin contact on the aroma composition of the musts of *Vitis vinifera* L. cv. Muscat of Bornova and Narince grown in Turkey. *Food Chemistry*, 81, 341– 347.
- Skinkis, P. A., Bordelon, B. P. & Butz, E. M. (2010). Effects of sunlight exposure on berry and wine monoterpenes and sensory characteristics of Traminette. *American Journal of Enology and Viticulture*, 61, 147 – 156.
- Stanka Herjavec, Ana Majdak (2002). The Influence of Maceration on the Composition of Some Volatile Compounds and Sensory Properties of Traminer Wines. *Agriculturae Conspectus Scientificus*, Vol. 67.p.p. ( 11-17).
- Zoecklein, B. W., Wolf, T. K., Marcy, J. E. & Jasinski, Y. (1998). Effect of fruit zone leaf thinning on total glycosides and selected aglycone concentrations of Riesling (*Vitis vinifera* L.) grapes. *American Journal of Enology and Viticulture*, 49, 35 – 43.